



Réseaux de Neurones modèles : Contrôle de la différenciation axonale par micropatterns

Sophie Roth

► To cite this version:

Sophie Roth. Réseaux de Neurones modèles : Contrôle de la différenciation axonale par micropatterns. Neurobiologie. Université de Grenoble, 2009. Français. NNT : . tel-01010302

HAL Id: tel-01010302

<https://theses.hal.science/tel-01010302>

Submitted on 26 Jun 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

présentée par

Sophie ROTH

Pour obtenir le titre de docteur de l'Université Joseph Fourier - Grenoble 1

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

Réseaux de Neurones modèles :
Contrôle de la différenciation axonale
par micropatterns

Composition du jury :

Mr. Brugg Bernard	Rapporteur
Mr. Piel Matthieu	Rapporteur
Mr. Dahan Maxime	Examineur
Mr. Fourcade Bertrand	Examineur
Mme. Catherine Villard	Directrice de thèse
Mme Sylvie Gory Fauré	Co-directrice de thèse
Mr. Brocard Jacques	Invité

Thèse préparée au sein du MCBT (Institut Néel, CNRS Grenoble), du CRETA (CNRS
Grenoble) et de l'Institut des Neurosciences de Grenoble
CNRS de Grenoble, BP 166, 25 avenue des martyrs, 38042 Grenoble cedex 09
(Laboratoires associés à l'Université Joseph Fourier - Grenoble)

Introduction générale

Le but du projet Neurofet dans lequel s'insère ma thèse est d'explorer quelques aspects dynamiques et computationnels de réseaux de neurones modèles. Un exemple de l'intérêt de l'aspect dynamique des réseaux de neurones est l'étude des phénomènes de synchronisation qui s'expriment *in vivo* dans les phases de sommeil à ondes lentes ou, de façon pathologique dans les crises d'épilepsie. L'étude de l'influence de l'activité spontanée (ou bruit) dans le traitement de l'information est également un des sujets actuels de recherche en neurosciences. C'est un des thèmes que nous cherchons à traiter en étudiant l'aspect computationnel de réseaux de neurones modèles. Pour réaliser de telles études, l'idéal serait de travailler directement sur le cerveau. Cependant, l'étude *in vivo* du réseau de neurones tridimensionnel qu'est le cerveau relève encore d'un pari inaccessible. C'est pourquoi beaucoup de travaux se sont attachés à montrer que la connectivité et les propriétés électriques d'un réseau bidimensionnel *in vitro*, formé à partir de cellules embryonnaires, étaient similaires à celles trouvées *in vivo*. Cependant, il manque à ces réseaux bidimensionnels formés aléatoirement l'architecture qui donne aux réseaux naturels leur fonction. C'est pourquoi se sont développées ces dernières années des techniques pour réaliser des réseaux à géométrie contrôlée. Le projet Neurofet consiste à cultiver des réseaux de neurones à architecture contrôlée directement sur des nanotransistors afin d'avoir une résolution subcellulaire de la propagation de l'influx électrique au sein du réseau et de pouvoir étudier de tels systèmes modèles sur de longues périodes. Pour concrétiser ce projet, essentiellement quatre laboratoires interagissent en apportant chacun leur spécialité. Le MCBT (Institut Néel, CNRS) et l'équipe 1 de l'Institut des Neurosciences de Grenoble, apportent pour l'un ses compétences en électronique et microfabrication et pour l'autre en neurosciences. Le GIPSA lab (Grenoble), quant à lui, nous fait bénéficier de ses compétences en traitement du signal. Enfin, le CRETA (Centre de recherche pour l'émergence de nouvelles technologies, CNRS), dans lequel le projet est implanté physiquement, favorise la collaboration entre plusieurs laboratoires.

Le but de ma thèse consistait à créer des réseaux de neurones modèles. Le contrôle de la position du corps cellulaire ainsi que du développement des neurites ayant été rapidement réalisé grâce à l'utilisation de micropatterns, nous avons rapidement commencé à nous intéresser au contrôle de la position de l'axone, pôle émetteur du neurone. Le contrôle de la différenciation axonale dans nos réseaux modèles était primordiale pour contrôler le sens de circulation de l'information dans nos

réseaux. Après avoir réalisé un état de l’art des mécanismes connus de la différenciation axonale, nous avons choisi de ne jouer que sur des contraintes physiques exploitant certaines propriétés connues de cette différenciation en créant des géométries originales d’adhésion. Nous avons donc exclu toute utilisation de molécules de guidance ou de mécanismes d’adhésion spécifique.

Dans une première partie, nous réaliserons une introduction aux neurones (Chapitre 1) et aux cellules cultivées sur micropatterns (Chapitre 2). Après avoir exposé les caractéristiques permettant au neurone de remplir sa fonction de cellule nerveuse, nous détaillerons plus particulièrement son développement en culture *in vitro*. Enfin, nous aborderons les propriétés connues de l’axone, dont nous cherchons à contrôler la position. Dans cette même partie, nous réaliserons un état de l’art de la technique que nous avons choisi d’utiliser : les micropatterns. Une seconde partie exposera les résultats obtenus au cours de cette thèse. Après un descriptif du matériel et méthodes utilisés (Chapitre 3), notre première idée de motif original ainsi que celui jouant sur une contrainte cellulaire exploitant le rôle et la position du centrosome dans la différenciation axonale seront exposés (Chapitre 4). Les conséquences d’une contrainte neuritique basée sur la relation suggérée dans la littérature entre tension mécanique et différenciation axonale sera ensuite développée (Chapitre 5). Enfin, le motif dessiné en vue d’un contrôle optimal de la position de l’axone, combinant les deux contraintes déterminées, sera présenté (Chapitre 6). Le dernier chapitre conclura ce manuscrit par un bilan des résultats, une discussion ainsi que sur l’exposé des perspectives ouvertes par nos travaux.

Table des matières

I	Introduction aux Neurones et aux cellules sur micropatterns	9
1	Le Neurone	11
1.1	Une cellule du système nerveux	13
1.1.1	Le cerveau	13
1.1.2	Le Neurone : une morphologie lui permettant de remplir son rôle de traitement de l'information	15
1.1.3	La structure interne du neurone	17
1.2	Le développement du neurone	23
1.2.1	L'adhérence, et les cultures <i>in vitro</i>	23
1.2.2	Le développement des neurones en culture <i>in vitro</i>	23
1.3	L'Axone	29
1.3.1	Le développement de l'axone	29
1.3.2	La mécanique de l'axone	34
1.3.3	Le guidage de l'axone <i>in vitro</i>	41
2	Des Cellules sur micropattern	45
2.1	Substrats micropatternés : du principe à la pratique	47
2.1.1	Le Principe	47
2.1.2	Définir les zones adhésives	48
2.1.3	Applications	51
2.2	Des neurones sur patterns	55
2.2.1	Des réseaux de neurones à architecture contrôlée	55
2.2.2	Contrôler la polarisation axonale avec des micropatterns	59

II	Vers un contrôle de la différenciation axonale	63
3	Matériel et Méthodes	67
3.1	Nos substrats	69
3.1.1	Traitement de surface : la silanisation	69
3.1.2	La définition du réseau	72
3.2	Culture de neurones et techniques biologiques	73
3.2.1	Culture de neurones d'hippocampe de souris	73
3.2.2	Les marquages sur cellules fixées	74
3.2.3	Les transfections et la vidéomicroscopie	76
3.3	Méthodes statistiques	78
3.3.1	Trouver l'intervalle de confiance à 95% d'un pourcentage observé	78
3.3.2	Comparer un pourcentage observé à un pourcentage théorique	78
3.3.3	Comparer deux pourcentages observés	78
3.4	Les programmes élaborés	80
3.4.1	Programme de découpage de photo et de tri automatique : programme labview	80
3.4.2	Reconnaissance de la forme des neurites et calcul des angles γ_1 et γ_2	81
3.4.3	Programme d'aide pour la détermination de la position du centrosome par rapport au motif : programme labview vision	84
4	Premières idées et contrainte du corps cellulaire	87
4.1	Un motif contrôle : mise en place de notre méthodologie	89
4.1.1	Déterminer l'efficacité d'orientation d'un motif : la méthodologie	89
4.1.2	Présentation du motif contrôle	90
4.1.3	Facteur d'orientation du motif contrôle : les résultats	91
4.2	Première idée : le motif boomerang BmA	93
4.2.1	Facteur d'orientation du motif	94
4.2.2	Questions ouvertes	95
4.3	Motif Cont-Bm et position du centrosome	97
4.3.1	La contrainte cellulaire du motif BmA : un nouveau motif Cont-Bm	97
4.3.2	Facteur d'orientation du motif Cont-Bm	97
4.3.3	Position du centrosome	98
4.4	Vers une contrainte géométrique des neurites	102

4.4.1	La contrainte angulaire du motif BmA : un nouveau motif Cont-A	102
4.4.2	Facteur d'orientation	102
4.4.3	Une contrainte plus ou moins efficace	103
5	Contrainte Neuritique	107
5.1	Des motifs jouant sur le rôle de la tension dans la différenciation axonale	109
5.1.1	L'idée de départ	109
5.1.2	Le développement d'un neurite sur une ondulation : notre modèle	110
5.1.3	Présentation des différents motifs	112
5.2	Facteur d'orientation des motifs	112
5.2.1	Etude des échecs d'orientation pour les motifs $W_{1.80}$ et $W_{2.00}$	116
5.3	Les décrochements	121
5.3.1	Zoom sur les décrochements	121
5.3.2	Eviter les décrochements : une confirmation du rôle de la tension	125
5.4	Tension et Position du centrosome ?	126
6	Le contrôle de la différenciation axonale	129
6.1	Un motif alliant contrainte neuritique et cellulaire	131
6.1.1	Présentation du motif	131
6.1.2	Facteur d'orientation	132
6.1.3	Position du centrosome	133
6.2	Amélioration du motif	136
6.2.1	Motif Soleil	136
6.2.2	Motif $Bm_{gap}W_{2.00}$	139
6.2.3	Facteur d'orientation	140
6.2.4	Position du centrosome	141
7	Discussion et perspectives	145
7.1	Bilan de nos résultats et utilisation de nos motifs	147
7.1.1	Bilan de nos résultats	147
7.1.2	Un outil pour le placement de l'axone : les atouts et les limites.	148
7.2	Les pistes ouvertes par nos travaux	149
7.2.1	La génération de tension dans les neurites	149

7.2.2	Le rôle du centrosome dans la différenciation axonale	151
7.3	Les perspectives	152
7.3.1	Déterminer quels paramètres des ondulations des motifs 'wavy' jouent sur la différenciation axonale.	153
7.3.2	Confirmer le rôle de la tension dans la différenciation axonale.	153
7.3.3	Déterminer les acteurs biologiques du développement d'une tension interne dans le neurite.	154
7.3.4	Déterminer la corrélation entre tension interne et mouvement du centrosome.	155

Première partie

Introduction aux Neurones et aux cellules sur micropatterns

Chapitre 1

Le Neurone



Le fonctionnement du cerveau reste encore de nos jours une fascination. Certainement du fait de la somme de questions fondamentales qui reste sans réponse. Pour essayer de comprendre comment fonctionne cet organe, il faut en particulier démêler les interconnexions d'une multitude de cellules nerveuses, les neurones, organisés en une myriade de systèmes et sous-systèmes. De part leur forme bien connue et très particulière, avec leur longues ramifications, on pourrait penser qu'elles n'ont pas de point commun avec les autres cellules. Cependant, le système nerveux dérive bien de la même cellule oeuf fertilisée que les autres organes et le neurone en a gardé des éléments communs à toutes les cellules de l'organisme. Dans ce chapitre nous verrons premièrement comment cette cellule remplit sa fonction de cellule nerveuse. Nous décrirons ensuite comment celle-ci se développe. Enfin, nous détaillerons dans la dernière partie son prolongement le plus intrigant, l'axone.

Sommaire

1.1	Une cellule du système nerveux	13
1.1.1	Le cerveau	13
1.1.2	Le Neurone : une morphologie lui permettant de remplir son rôle de traitement de l'information	15
1.1.3	La structure interne du neurone	17
1.2	Le développement du neurone	23
1.2.1	L'adhérence, et les cultures <i>in vitro</i>	23
1.2.2	Le développement des neurones en culture <i>in vitro</i>	23
1.3	L'Axone	29
1.3.1	Le développement de l'axone	29
1.3.2	La mécanique de l'axone	34
1.3.3	Le guidage de l'axone <i>in vitro</i>	41

1.1 Une cellule du système nerveux

Chez la plupart des organismes multicellulaires, les cellules ne sont pas toutes identiques. Grâce à la différenciation, les cellules d'un organisme se spécialisent pour répondre à une fonction particulière. Celle-ci peut entraîner des changements dans de nombreux aspects de la physiologie de la cellule, relatifs à sa fonction biologique. Sa taille, forme, polarité, activité métabolique ou sensibilité à certains signaux peuvent être modifiées. De la cellule souche au neurone, celui-ci acquiert donc les caractéristiques morphologiques qui lui permettront d'assurer son rôle de traitement de l'information.

Nous verrons dans une première partie l'environnement du neurone puis détaillerons les différentes morphologies particulières que celui-ci peut adopter dans le but de traiter l'information. Enfin, nous détaillerons la structure interne du neurone, qui garde de nombreux points communs avec les autres cellules de l'organisme.

1.1.1 Le cerveau

Le cerveau est certainement l'organe le plus intrigant des êtres vivants. Il est composé, chez l'homme, de plus de 100 milliards de neurones. Cependant, les neurones ne sont pas les seules cellules du système nerveux. Des cellules appelées cellules gliales, environ 25 fois plus nombreuses, en font également partie intégrante. Nous découvrirons dans une première section quelles sont ces cellules méconnues du grand public et leur rôle. Nous verrons ensuite comment les cellules du système nerveux s'organisent pour pouvoir accomplir les nombreuses tâches que le cerveau remplit.

Les cellules gliales

Contrairement aux neurones, les cellules gliales peuvent se diviser. Elles leur procurent entre autre un support mécanique et maintiennent un environnement adéquat pour la transmission des signaux nerveux. Il existe trois types de glies, de géométrie et rôles très différents : la microglie, les oligodendrocytes et les astrocytes.

- Les oligodendrocytes produisent une gaine de myéline qui accélère la conduction nerveuse.
- La microglie protège les neurones contre des corps étrangers en cas de lésions par exemple.
- Les astrocytes ont pour fonction principale de maintenir un environnement chimique adéquat pour la production de signaux nerveux. Ils ont en effet un rôle actif dans le métabolisme et l'alimentation en glucose des neurones.

De récentes études ont montré qu'il pourraient également jouer un rôle dans la transmission de l'influx nerveux . A travers le réseau astrocytaires pourraient se propager des vagues d'ions calcium dont l'effet régulateur pourrait se faire sentir dans un grand nombre de synapses en même temps. Les prolongements astrocytaires qui entourent les synapses pourraient ainsi exercer un contrôle plus global sur la concentration ionique et le volume aqueux dans les fentes synaptiques. Le réseau astrocytaire constituerait donc un système de transmission non-synaptique qui se superposerait au système neuronal pour jouer un rôle majeur de modulation des activités neuronales (Laming PR, 2000).

Le Neurone en réseau

Le cerveau est un réseau complexe de neurones organisés en systèmes et sous systèmes imbriqués. Il peut être découpé en différentes aires fonctionnelles, chacune ayant des tâches différenciées. On peut retrouver chez les différents animaux des similitudes dans l'organisation de leur cerveau et de leurs zones fonctionnelles (Fig.1.1). Ces zones seront plus ou moins développées selon le besoin de l'espèce. Le bulbe olfactif, par exemple, responsable du traitement des messages odorants, est beaucoup plus développé chez le rat que chez l'homme.

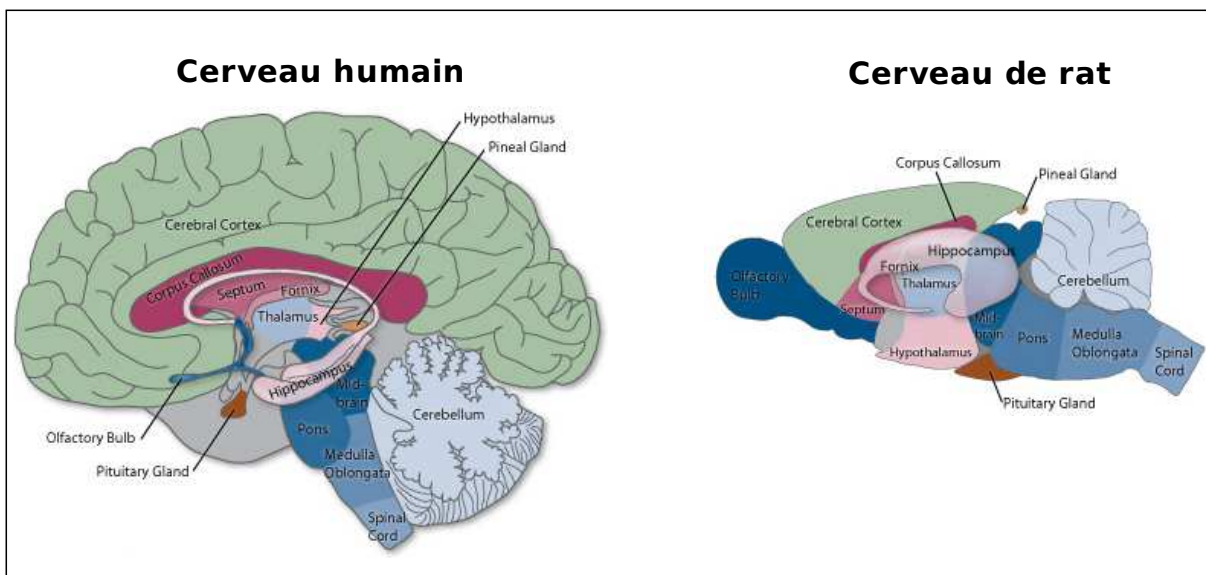


FIGURE 1.1: Exemple de découpage par zones fonctionnelle du cerveau humain à gauche et de rat à droite. Bien que ces deux cerveaux possèdent des similitudes, les zones sont plus ou moins développées selon le besoin de l'espèce.

Chacune de ces zones possède une architecture bien particulière qui est reliée à sa fonction biologique. Ainsi, les systèmes sensoriels tels que la cochlée ont une architecture en parallèle. L'hippocampe, responsable entre autre de la mémoire associative est constitué de trois masses de neurones connectées uni-directionnellement, lui donnant une architecture en "boucle". Comprendre comment chaque organisation particulière des différentes zones du cerveau permet d'effectuer des tâches différentes est un challenge sur lequel beaucoup d'équipes se penchent.

Une des caractéristiques des réseaux de neurones est le fait qu'ils évoluent constamment. Ce phénomène est appelé plasticité. Les connexions peuvent se renforcer par une synapse plus effective par exemple, ou au contraire disparaître. De nouvelles connexions peuvent également être créées. C'est grâce à cela que l'apprentissage est possible.

1.1.2 Le Neurone : une morphologie lui permettant de remplir son rôle de traitement de l'information

Lors de la genèse du cerveau, des neuroblastes (cellules souches neuronales) vont se différencier en neurones qui seront dès lors incapables de se diviser. Ils ont pour rôle de traiter l'information et possèdent donc des caractéristiques propres qui leur permettent de recevoir et de transmettre un message nerveux. Nous décrirons dans cette partie la morphologie de ces cellules, puis nous verrons comment elles arrivent à traiter de l'information.

Une morphologie particulière pour le traitement de l'information

Les neurones sont des cellules hautement polarisées qui ont une forme et une organisation bien particulière. Autour de leur corps cellulaire, des prolongements plus ou moins longs s'étendent, leur permettant de se connecter avec leurs plus proches voisins comme avec des cellules très éloignées. Deux types de prolongements accomplissent des rôles biologiques différents : l'axone et les dendrites.

Chaque neurone est unique de par la place, le rôle qu'il occupe dans le système nerveux, et les connexions qu'il a établi. Ces particularités vont se traduire au niveau morphologique par des différences de formes et de taille des corps cellulaires, mais aussi dans l'organisation de ses prolongements. La géométrie de l'axone et des dendrites, par exemple, peut être radicalement différente selon le type de neurones (Fig.1.2/A). De même, certains types de neurones possèdent plusieurs axones. Ainsi, il existe par exemple des neurones bipolaires qui ont un axone et une dendrite de longueurs équivalentes, des multipolaires qui ont un long axone et plusieurs dendrites

ou également des pseudo-unipolaires (qui ont un court prolongement qui se subdivise en deux, l'un faisant office de dendrite et l'autre d'axone)(Fig.1.2/B). Il existe plus de 200 variétés de neurones.

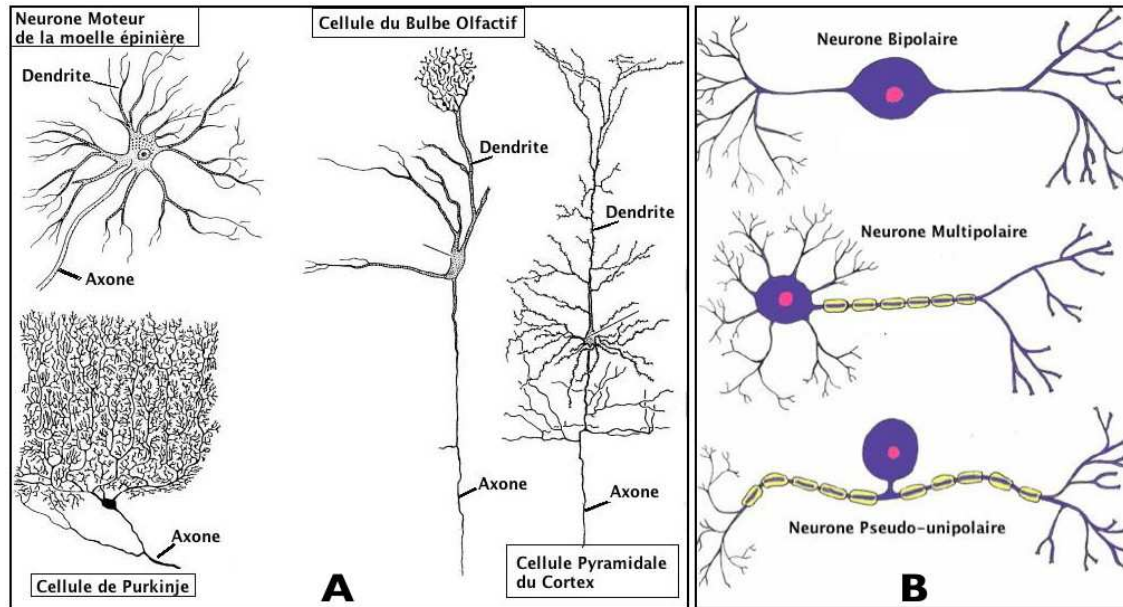


FIGURE 1.2: Exemples de différentes morphologies neuronales. A/ Exemple de cellules de certaines régions du cerveau. B/ Exemple d'un des classements par morphologie des neurones

Le traitement de l'information

Nous venons de voir que les neurones possèdent deux types de prolongements différents : l'axone et les dendrites. Les dendrites ainsi que le corps cellulaire sont le pôle récepteur (pôle somato-dendritique). L'axone est le pôle émetteur du neurone, transmettant l'information au neurone suivant. La communication entre neurones s'effectue via des synapses, sites de communication principalement chimiques. Le neurone reçoit les signaux provenant des différents neurones le connectant et les intègre (dans le cortex par exemple, un neurone développe environ 10^4 connexions). Si la somme de ces signaux dépasse un certain seuil, le neurone générera un potentiel d'action. Ce potentiel d'action est une inversion brutale et transitoire du potentiel de membrane qui se propage sans atténuation tout au long de l'axone. Le potentiel membranaire de repos, négatif (environ -80mV), provient d'une différence de concentrations d'ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule rendue possible grâce à la présence de pompes ioniques sur la membrane. Son inversion correspond donc à une entrée d'ions positifs Na^+ à l'intérieur du neurone. Son arrivée à l'extrémité de l'axone

provoque la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs sont captés par les récepteurs du neurone suivant. Selon le type de neurotransmetteurs, la quantité émise et le nombre de récepteurs disponibles, cela créera au niveau du neurone suivant une hyperpolarisation ou une dépolarisation transitoire plus ou moins importante de la membrane. On appelle ces signaux de faibles amplitude (environ 5mV) potentiels post-synaptique excitateurs ou inhibiteurs.

1.1.3 La structure interne du neurone

Les cellules eucaryotes animales, dont les neurones font partie, possèdent une structure de base commune. Nous verrons dans cette section les composants essentiels de ces cellules ainsi que l'organisation particulière des prolongements des neurones.

La structure générale d'une cellule eucaryote animale

La cellule eucaryote, de taille typique comprise entre 10 et 100 μ m, est délimitée par une membrane plasmique (Fig.1.3). C'est une bicouche lipidique de 5 à 10 nm d'épaisseur traversée par des protéines ayant le rôle, entre autre, de canaux ou de récepteurs aux molécules extérieures. Ces protéines, qui représentent 50% de la masse de la membrane plasmique, permettent de faire le lien entre l'espace extérieur et intérieur de la cellule, appelé le cytoplasme. Celui-ci est composé d'un milieu, le cytosol, dans lequel baignent le noyau portant le matériel génétique de la cellule, et de différents organites cellulaires permettant par exemple de produire de l'énergie (mitochondries) ou de synthétiser des protéines (ribosomes, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi). Il renferme également un réseau de protéines, le cytosquelette, qui confère à la cellule sa forme, ses propriétés mécaniques et son organisation (Nicolas, 2007). C'est grâce à lui, entre autre, que la cellule peut se déformer, se déplacer et explorer son environnement. Ainsi, il est impliqué dans la forme de la cellule, sa polarité et dans l'ancrage des organites et structures cellulaires. C'est également grâce à lui que la cellule peut générer des forces de tension ou des forces lui permettant de se mouvoir et de mouvoir les organites cellulaires. Il est composé de polymères biologiques qui diffèrent notamment par leur taille, rigidité, protéines associées. Ces trois polymères sont les microtubules, l'actine et les filaments intermédiaires.

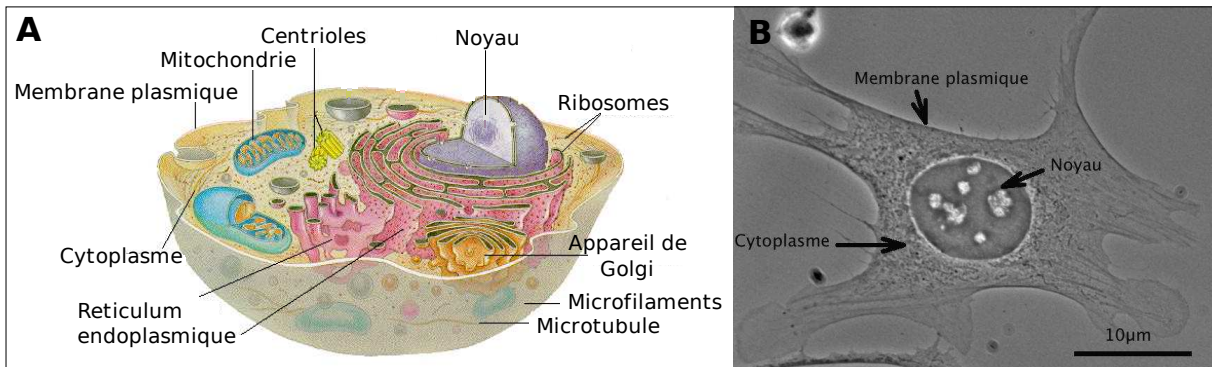


FIGURE 1.3: **Organisation d'une cellule eucaryote.** A/ Schéma d'une cellule eucaryote animale avec ses composants essentiels. B/ Fibroblaste en contraste de phase. On peut distinguer le noyau la membrane et le cytoplasme. (avec l'accord de Benoît Vianay, Institut Néel)

Les filaments d'actine (également nommés **actine F** ou **filamenteuse**), de diamètre avoisinant les 7nm et de longueur de persistance 17µm*, sont des filaments polarisés et assez flexibles. Ce sont des structures dynamiques formées de monomères d'actine, l'actine G, arrangés en double hélice (Fig.1.4). Il y a assemblage majoritaire au bout + des filaments et désassemblage majoritaire au bout -.

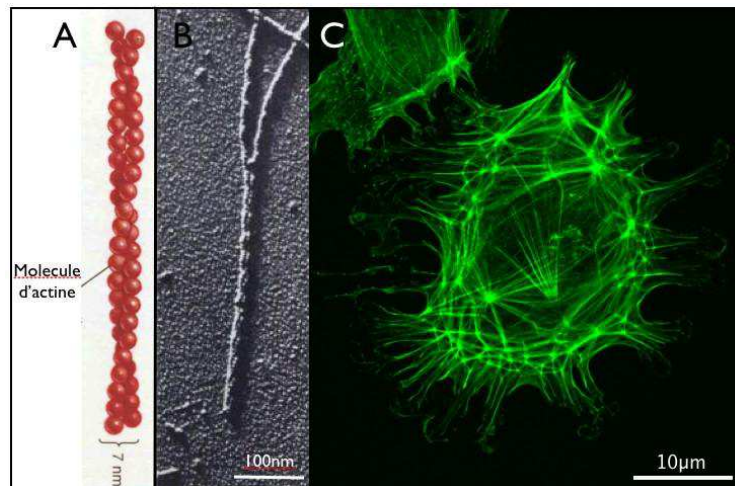


FIGURE 1.4: **Filaments d'actine.** A/ Schéma de l'organisation en double hélice des monomères d'actine G. B/ Microscopie électronique d'un microfilament d'actine. C/ Microfilaments d'actine (en vert) dans une cellule en culture *in vitro* (Source : [http : //scienceblogs.com/transcript/upload/2007/01](http://scienceblogs.com/transcript/upload/2007/01))

Des protéines associées à l'actine permettent de rendre les filaments plus ou moins stables et de

*. Longueur de corrélation de l'orientation d'un monomère. Ce paramètre moléculaire traduit donc la rigidité d'un polymère. Plus la longueur de persistance est grande, plus le polymère est rigide.

les organiser spatialement. Ceux-ci peuvent se présenter sous la forme de faisceaux parallèles, anti parallèles (également appelés contractiles), ou en réseaux formant des mailles (Jockusch, 1983). Dans la cellule, ces organisations d'actine se retrouvent dans les protrusions membranaires qui lui permettent d'explorer son environnement : les filopodes et les lamellipodes. C'est effectivement l'assemblage de ces structures qui va permettre de pousser la membrane plasmique. Les filopodes et les lamellipodes sont des structures différentes. Les premiers sont fins et longs et composés de faisceaux d'actine parallèles. Quant aux lamellipodes, ils sont constitués d'un réseau relativement lâche de fibres d'actine, avec beaucoup d'interconnexions quasiment orthogonales. On retrouve également ce type de réseau d'actine sous la membrane plasmique. On l'appelle alors actine corticale. Les faisceaux anti-parallèles permettent d'exercer des tensions dans la cellule grâce à la myosine, moteur moléculaire qui permet de faire glisser les différents filaments antiparallèles. On retrouve ces fibres contractiles (également appelées fibres de stress) par exemple lorsqu'une cellule forme des connexions stables avec un substrat (Nicolas, 2007) . Ces faisceaux d'actine antiparallèles sont alors connectés aux adhésions focales. La taille typique de ces contacts est de l'ordre du μm .

Les microtubules ont un diamètre de 22nm et une longueur de persistance de 5mm. Ce sont les filaments les plus rigides du cytosquelette du fait de leur structure tubulaire, dont les parois sont constituées de plusieurs protofilaments de tubulines, eux-même formés de dimères de tubuline alpha et beta organisés longitudinalement. Comme les microfilaments d'actine, ce sont également des filaments polarisés. Il y a assemblage au bout + et désassemblage constant au bout - (Fig.1.5). Les microtubules sont nucléés à partir d'un centre organisateur, le centrosome (composé de deux centrioles) (Mitchison T, 1984). Le réseau de microtubules joue de nombreux rôles dans la cellule. Il sert notamment de rails pour le transport de vésicules et organites. En effet, des moteurs moléculaires associés aux microtubules les transportent vers le bout + (kinésine) ou le bout - (dynéine) du microtubule (SF, 1998). De plus, lors de la division cellulaire (mitose), le réseau de microtubules se réorganise pour former le fuseau mitotique, qui permettra de séparer les chromosomes dupliqués des deux futures cellules filles. Les microtubules jouent également un rôle dans le maintien de la structure tridimensionnelle cellulaire. Afin d'assurer leurs fonctions, ils sont finement régulés par des protéines associées (qui les stabilisent et les organisent) et coopèrent avec les autres filaments du cytosquelette.

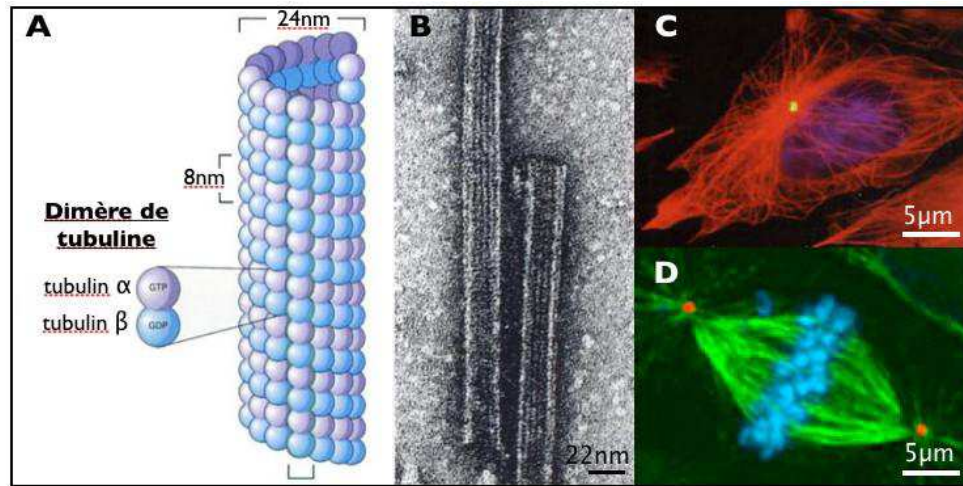


FIGURE 1.5: **Les Microtubules.** A/ Schéma de l'organisation des microtubules. B/ Microscopie électronique d'un microtubule. C et D/ Visualisation de l'organisation des microtubules dans des cellules. C/ cellule en culture (microtubules en rouge, centrosome en jaune). D/ cellule en mitose (microtubules en vert, chromosomes en bleu et centrosomes en rouge) Source : <http://www.vibrallife.fr/ln/design/images>

Les filaments intermédiaires ont un diamètre de l'ordre de 10nm. Ces structures semblent être moins dynamiques que les microtubules et les filaments d'actine. Bien que leur structure moléculaire dépende du type cellulaire, ils sont tous formés de dimères de protéines organisés en protofilaments eux-mêmes associés en hélice, généralement de 8 protofilaments (Fig.1.6). Ce sont des polymères stables qui contribuent entre autre au maintien de la forme cellulaire et à l'ancrage des organites cellulaires.

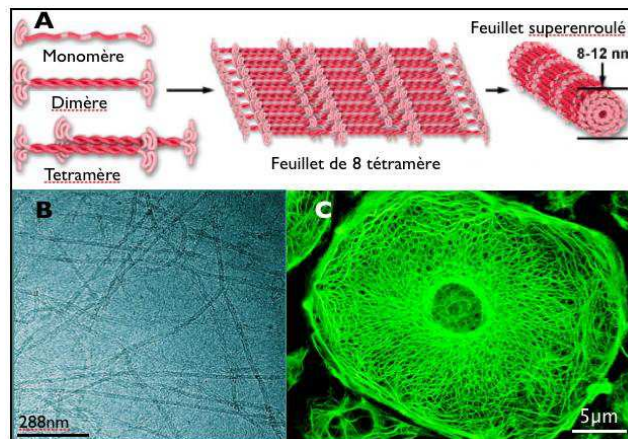


FIGURE 1.6: **Les Filaments intermédiaires.** A/ Schéma de l'organisation des filaments intermédiaires. B/ Microscopie électronique de filaments intermédiaires. C/ Visualisation de l'organisation des filaments intermédiaires dans une cellule épithéliale de rat.

L'organisation particulière de l'axone et des dendrites

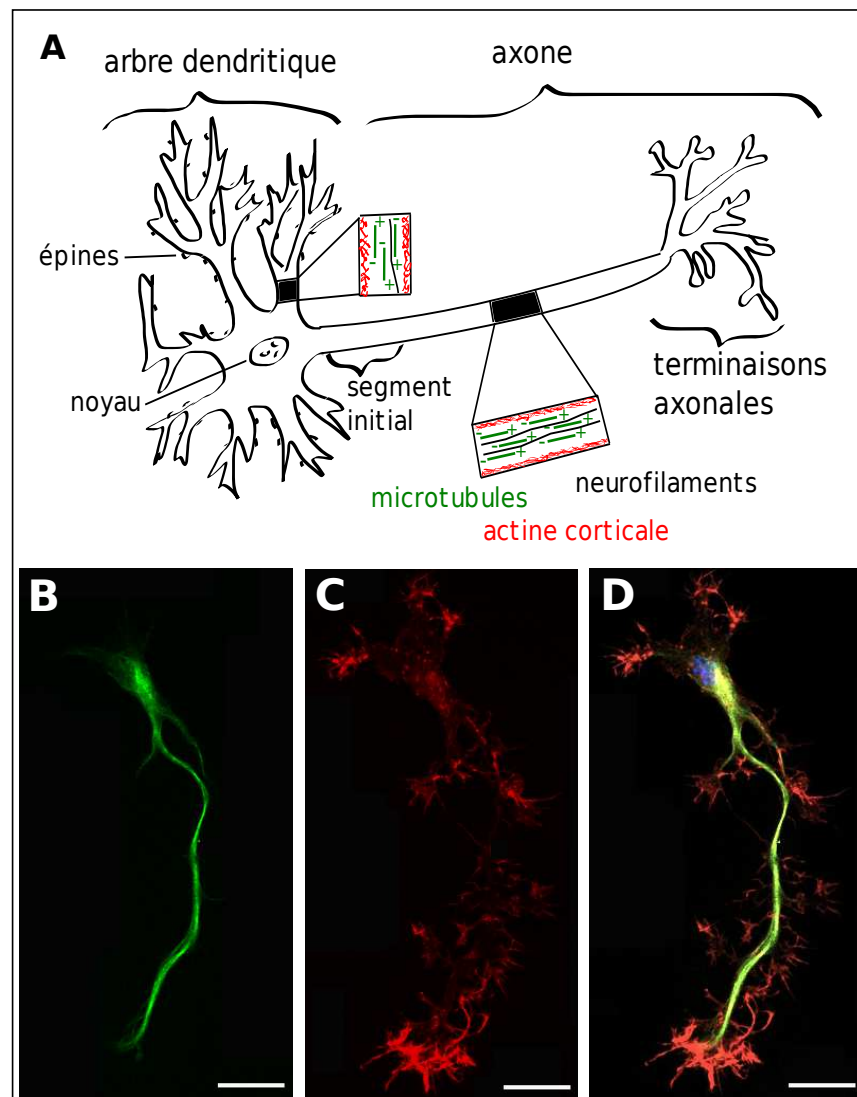


FIGURE 1.7: **L'organisation du cytosquelette neuronal.** A/ Schéma de la structure d'un neurone. B/C/D/ Cytosquelette d'un neurone d'hippocampe de souris : B/ Microtubules C/ Microfilaments d'actine D/Microtubules en vert, Microfilaments d'actine en rouge, Noyau en bleu. L'échelle représente 20µm.

Sous la membrane des dendrites, pôles récepteurs du neurone, se trouve de l'actine corticale. Elles sont remplies de neurofilaments (filaments intermédiaires des neurones) et de faisceaux de microtubules, orientés longitudinalement au prolongement mais pouvant avoir des polarités inversées (Fig.1.7). Ainsi, dans les dendrites, on retrouve des microtubules avec leur bout + ou bout - vers le corps cellulaire. Des ribosomes sont transportés vers la périphérie par les microtubules ayant leur extrémité + du côté somatique, suggérant la possibilité de synthèse protéique dans

les dendrites, principalement des protéines du cytosquelette (Elhers, 2007). On retrouve d'ailleurs également des spots de Golgi dans la zone proximale des dendrites (Elhers, 2007). pour assurer leur rôle de pôle récepteur, la membrane des dendrites est parsemée de petites boursofflures nommées épines dendritiques qui sont souvent le siège de synapses (un neurone peut en avoir entre un millier et une centaine de milliers). Elles sont donc riches en récepteurs post-synaptiques. Ces épines sont remplies de filaments d'actine (Fiala JC, 2002).

L'axone, pôle émetteur du neurone, se différencie morphologiquement des dendrites par son aspect lisse et son diamètre constant. Sa longueur peut être très variable selon le type de neurones : du μm au m. Comme les dendrites, l'axone contient de l'actine corticale sous sa membrane, des neurofilaments ainsi que des faisceaux de microtubules. En revanche, ces microtubules sont tous orientés avec leur bout + vers l'extrémité de l'axone (Baas PW, 1988). Dans la région proximale de l'axone se trouve le segment initial. Sa structure lui permet d'initier le potentiel d'action. Il y a en effet une concentration beaucoup plus importante de canaux ioniques (Lisiecka ZM, 2008). La partie terminale est en général arborisée et chacune se termine en une région spécialisée que l'on appelle bouton synaptique. Il s'agit de la zone pré-synaptique de la synapse. Elle contient un réseau d'actine auquel sont ancrés principalement les vésicules de neurotransmetteurs, des mitochondries en très grand nombre pour fournir de l'énergie. L'axone peut représenter un volume cytoplasmique bien plus important que le reste de la cellule, et pourtant, il est incapable de synthétiser les protéines nécessaires au renouvellement de ses macromolécules constitutives (Craig AM, 1992). Des transports axonaux permettent le transfert bidirectionnel des molécules du soma aux terminaisons axonales. Des vésicules de transport amènent par exemple le long des microtubules le matériel nécessaire au renouvellement de la membrane.

1.2 Le développement du neurone

Dans cette section, nous aborderons l'importance de l'adhérence dans le développement d'une cellule, et notamment *in vitro*. La croissance particulière des neurones en culture sera ensuite exposée.

1.2.1 L'adhérence, et les cultures *in vitro*

Il est nécessaire pour la survie de la plupart des cellules d'adhérer, soit avec d'autres cellules, soit avec la matrice extracellulaire qui les entoure. Cette interaction avec le milieu extérieur génère toute une cascade de signaux essentiels à de multiples fonctions cellulaires telles que la migration, prolifération, différenciation ou mort programmée (apoptose). Une cellule adhère en des points particuliers de contact où se trouvent des récepteurs d'adhésion. Ces récepteurs d'adhésion, sortes de 'sondes', permettent de traduire les informations spatiales, mécaniques et protéiques du milieu extérieur de la cellule. Ce sont des protéines transmembranaires qui mettent en relation le milieu extracellulaire avec le cytosquelette, afin de permettre à la cellule de réagir en fonction de son environnement. Celle-ci peut par exemple choisir de rester à son emplacement et de renforcer ses points d'ancrage ou moduler ses sites d'adhésion et migrer vers un emplacement plus propice à son activité. Il y a donc des relations très importantes entre les récepteurs d'adhésion et le cytosquelette de la cellule.

Afin de simplifier de nombreuses études, les cellules peuvent être cultivées *in vitro*. Il s'agit de les placer sur un substrat adapté pour leur adhésion, dans un milieu et conditions adéquats à leur survie. La dureté du substrat, les molécules d'adhésion utilisés par exemple, peuvent modifier le développement des cellules. Pour le cas des neurones, les cultures sont primaires, c'est à dire que les cellules proviennent directement du tissu cérébral. Il est donc nécessaire de les prélever à chaque fois que l'on veut faire une culture directement dans le tissu vivant. Souvent, les neurones proviennent d'embryons ou de nouveau nés de souris ou de rat nécessitant des croisements en amont.

1.2.2 Le développement des neurones en culture *in vitro*

Les neurones prélevés sont des neurones déjà différenciés, provenant d'un tissu que l'on a dissocié chimiquement et mécaniquement. On a donc coupé les connexions que les neurones avaient déjà mis en place. Après dissociation, les cellules se présentent sous la forme de petites sphères.

Une fois prélevés, les neurones sontensemencés sur des substrats leur permettant d'adhérer et de se développer dans un milieu et un environnement adéquat à leur survie. Spontanément, ces neurones vont redévelopper des petits prolongements appelés neurites et se connecter de façon aléatoire pour former des réseaux. Ces connexions sont nécessaires à leur survie.

Les différentes molécules d'adhésion et leur influence sur la pousse neuronale

Les neurones ont cultivés sur des substrats recouverts de molécules qui leur permettent d'adhérer. Le choix de ces molécules influencera non seulement la force avec laquelle le neurone va adhérer mais aussi la façon dont il va se développer. Sa vitesse de pousse, fasciculation (tendance pour un neurite à croître le long d'autres neurites) par exemple peuvent être modifiées (Lemmon V, 1992) (Chang S, 1998). Les vitesses de pousse peuvent être jusqu'à plus de dix fois plus élevées sur certaines molécules d'adhésion.

Différentes molécules d'adhérence sont utilisées *in vitro*. On peut distinguer deux grandes catégories : les molécules d'adhésion spécifiques, telles que la laminin, fibronectine, collagène ou L1 par exemple, vont se lier à un récepteur particulier de la membrane du neurone. Les molécules d'adhésion non spécifiques, telles que la poly-L-lysine ne se lient pas à un récepteur particulier de la membrane. Le mécanisme par lequel le neurone peut adhérer sur ce type de molécule n'est pas encore complètement élucidé. Il semble que des protéines provenant du sérum, dans lequel les neurones se développent pendant les premières heures de la mise en culture, s'adsorbent sur la surface permettant ainsi au neurone d'adhérer. Ces molécules semblent être attirées vers la poly-L-lysine par effet électrostatique. Cependant la ou les natures exactes des protéines d'adhésions impliquées ne sont pas connues.

Les étapes du développement d'un neurone en culture

Les différentes étapes du développement d'un neurone en culture ont été bien caractérisées sur des cultures de neurones d'hippocampe de rat (Fig.1.8) (Dotti CG, 1988). Peu de temps après l'ensemencement, des lamellipodes se développent autour du corps cellulaire (stade 1). Quelques heures plus tard, de petits prolongements appelés neurites se forment (stade 2). S'ensuit l'élongation plus rapide d'un des neurites. La cellule est alors nettement polarisée (stade 3 de développement). Ce plus long prolongement deviendra l'axone. Quelques jours plus tard, les autres neurites se différencient en dendrites. Le réseau de neurone ne sera mature, c'est à dire avec des connexions fonctionnelles qu'au bout de 10 à 12 jours (stade 5).

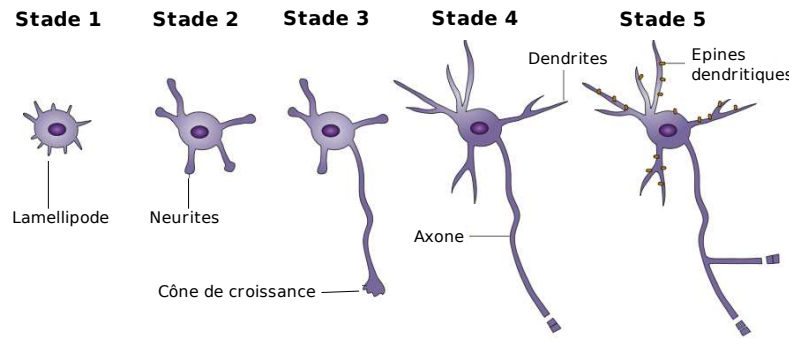


FIGURE 1.8: Développement d'un neurone en culture *in vitro*. (Arimura N, 2007)

Lors de la croissance du neurone, des structures appelées cônes de croissance se trouvent au bout des neurites en développement. Ce sont elles qui génèrent les forces nécessaires à l'avancée des neurites. C'est grâce à cette structure que l'axone en croissance se dirige vers sa cible adéquate. Il est hautement dynamique et très sensible à l'environnement extracellulaire, ce qui lui permet d'adapter sa direction et son avancée. La relation entre l'adhésion et le cytosquelette est donc très importante dans cette région, et très étudiée. Le cône de croissance peut être vu comme la 'locomotive' de l'axone en développement. Il génère en effet les forces nécessaires à l'avancée de l'axone. Le cône est constitué de trois zones : le zone centrale où l'on retrouve les microtubules, une zone périphérique constituée de lamellipodes et de filopodes et une zone de transition au milieu (Suter DM, 1998) (Fig.1.9). Dans la zone périphérique, se trouve un assemblage de filaments d'actine au niveau des lamellipodes et filopodes couplé à un flux rétrograde d'actine venant s'opposer à l'avancée constante dans la zone centrale des microtubules. C'est dans la zone de transition que les microtubules et le flux rétrograde d'actine entrent en contact. Il a été récemment montré que la myosine II se trouvait en quantité importante dans cette zone . Ce serait elle qui permettrait de garder les microtubules maintenus en faisceaux afin qu'il puissent s'opposer sans se courber au flux rétrograde d'actine (Burnette DT, 2008). C'est ce noeud qui permettrait de transmettre les forces développées par le cône de croissance au neurite. Une des hypothèses concernant la modulation du flux rétrograde d'actine fait intervenir l'adhésion au substrat. Quand le cône de croissance rencontre un substrat attracteur, les récepteurs de surface du cône de croissance se lient au substrat, et semblent former des liens fonctionnels avec le cytosquelette d'actine, le stabilisant. Le flux rétrograde d'actine serait alors atténué entraînant une elongation de l'axone vers la direction attractive (Fig.1.10) (Suter DM, 1998).

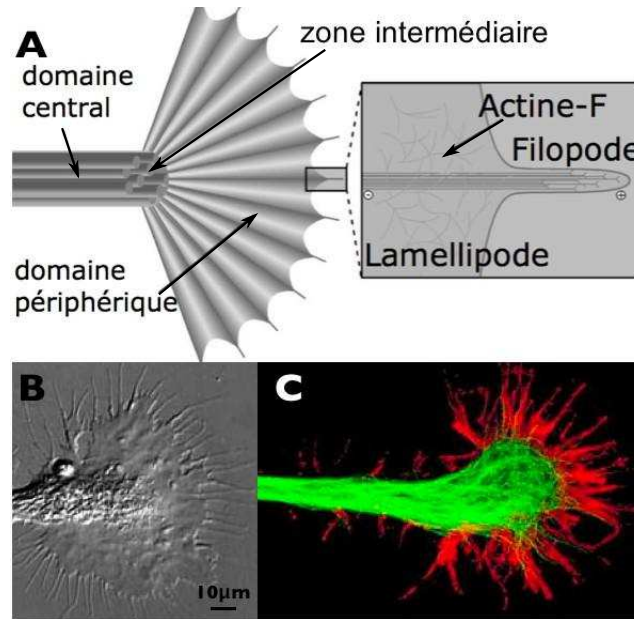


FIGURE 1.9: **Le cône de croissance du neurone.** A/ Schéma des différentes zones du cône de croissance. B/ Cône de croissance en contraste de phase (Source : cellbio.emory.edu). C/ Immunofluorescence du Cône de croissance : microtubules en vert, F-actine en rouge (Source : NIH).

Les forces développées par les filopodes et lamellipodes d'un cône de croissance ont été mesurées (Cojoc D, 2007). Un filopode peut exercer une force de 3pN alors qu'un lamellipode peut exercer une force supérieure à 20pN. Bien que les auteurs n'aient pas pu mesurer l'intégralité de la force développée par un lamellipode, ils s'attendent à trouver un ordre de grandeur d'une centaine de pN, comparables aux lamellipodes de cellules épithéliales en migration. L'inhibition de la myosine II ou la dépolymérisation des microtubules réduit considérablement le mouvement et la force exercée par le lamellipode alors que le filopode n'est pas affecté et continue de générer des forces de l'ordre de 3pN. Sans polymérisation de l'actine, aucune force n'est produite, ni dans les lamellipodes, ni dans les filopodes. Cela suggère que le développement de forces supérieures à 3pN requiert la coopération et l'interaction des filaments d'actine et des microtubules. Il semble donc que les filopodes génèrent de faibles forces afin d'explorer l'environnement et que les lamellipodes exercent des forces plus importantes pour permettre au neurite d'avancer, malgré les obstacles éventuels rencontrés.

Des structures ressemblant à des cônes de croissance ont été observées dans des cultures *in vitro* d'hippocampes de rat, parcourant à une vitesse d'environ $2\mu\text{m}/\text{min}$ les différents neurites de façon antérograde lors de leur développement, à l'image de 'vagues' (Fig.1.11) (Ruthel G, 1998a). Ce

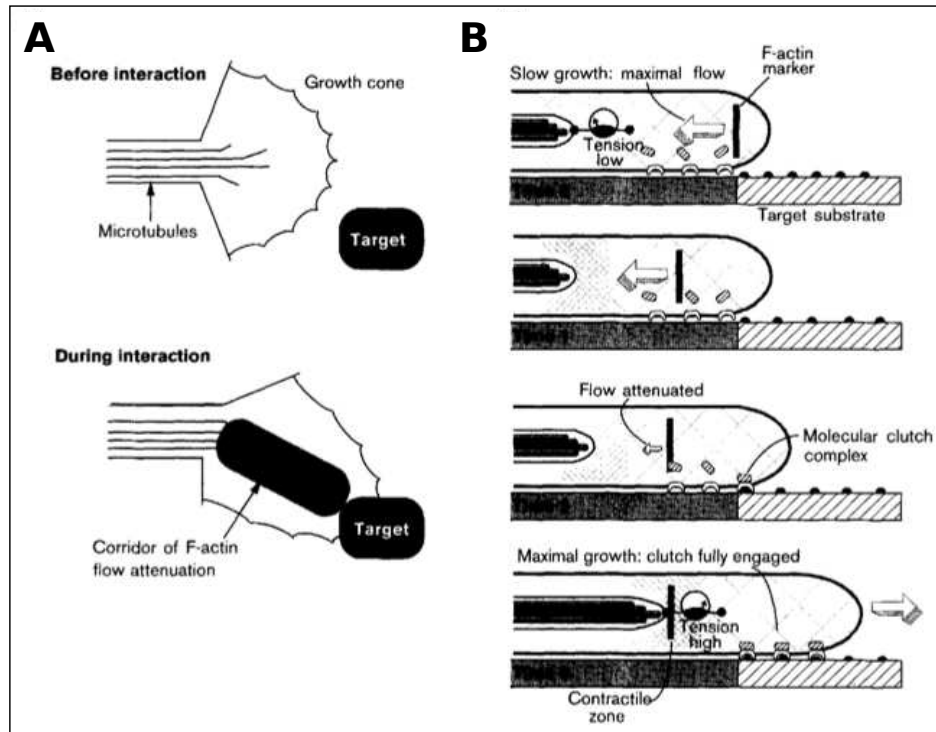


FIGURE 1.10: Réarrangement du cytosquelette lors de l'interaction entre le cône de croissance et sa cible. A/ Réorientation des microtubules vers une cible attractive après contact préalable avec un filopode ou lamellipode. L'extension des microtubules se réalise dans un couloir où le flux rétrograde d'actine est atténué. B/ Mécanisme possible de l'avancée du cône de croissance par un couplage entre le cytosquelette et le substrat. Un complexe moléculaire se forme permettant de faire le lien entre le substrat et le cytosquelette d'actine (clutch). La stabilisation de l'actine entraîne une atténuation du flux rétrograde (Suter DM, 1998).

type de vagues a également été occasionnellement observé avec un mouvement rétrograde (moins de 5% des vagues ont un mouvement rétrograde.). Ces vagues sont similaires au cône de croissance dans leur dynamique, leur structure et leur composition (Flynn KC, 2009) (Ruthel G, 1998a). Leur arrivée au bout des neurites semble être corrélée à leur élongation, et à une dynamique plus importante du cône de croissance (Ruthel G, 1998b). C'est pourquoi elles sont supposées apporter le matériel nécessaire à la pousse des neurites. Les vagues contribuent également à la pousse axonale et à la création de nouveaux embranchements (Flynn KC, 2009). Elles sont en effet plus fréquentes dans l'axone lors de son développement (environ 2 fois plus de vagues dans l'axone en développement que dans les autres neurites). L'une des questions qui reste ouverte est de savoir si ces vagues sont capables d'exercer des tensions, à l'image des cônes de croissance. Ces vagues ont été très peu étudiées mais une légère rétraction du neurite semble précéder l'arrivée de

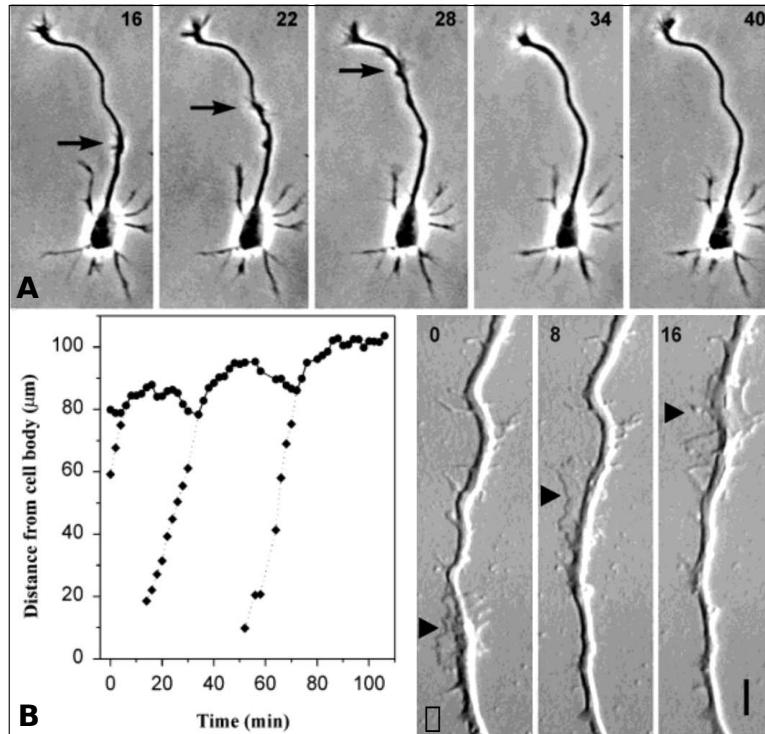


FIGURE 1.11: **Les vagues : structures ressemblants au cône de croissance.** A/ Propagation d'une vague le long d'un axone (indiquée par une flèche) dans une succession d'images d'un neurone d'hippocampe de rat à 30h de culture. Le nombre en haut à droite de chaque photo indique les minutes écoulées (Ruthel G, 1998b). B/ Diagramme de la longueur de l'axone (ronds) et de la position de la vague (losanges) en fonction du temps. L'axone se rétracte légèrement avant l'arrivée de la vague puis s'allonge brusquement lors de son arrivée (Ruthel G, 1998b). C/ Propagation d'une vague à plus fort grossissement d'un neurone d'hippocampe de rat après 24h de culture. Le nombre en haut à droite de chaque photo indique les minutes écoulées (Ruthel G, 1998b). La barre d'échelle mesure $5\mu\text{m}$.

la vague au niveau du cône de croissance (Ruthel G, 1998b). Si cette rétraction est réellement due à l'arrivée de la vague, cela pourrait indiquer une élévation de la tension (voir partie 1.3.2 page 37).

1.3 L’Axone

Lors de la différenciation axonale, un des neurites va acquérir les fonctions biologiques nécessaires pour devenir un axone. Qu’est-ce qui détermine quel neurite va devenir l’axone ? Est-ce prédéterminé ? Existe-t-il des signes, aux premiers stades de développement qui vont nous indiquer quel neurite deviendra l’axone ? Est-il possible de contrôler cette différenciation ? Ces questions sont d’un enjeu crucial pour la recherche, autant pour créer des circuits neuronaux *in vitro* (où contrôler le sens de l’information pourrait s’avérer de première nécessité) que dans un souci thérapeutique, pour la régénération neuronale *in vivo*.

Pour tenter de comprendre les mécanismes de la différenciation axonale, de nombreuses études sur l’apparition de la polarité neuronale ainsi que sur les propriétés physiologiques de l’axone ont été menées *in vitro*. Nous découvrirons dans cette partie les caractéristiques d’un axone, depuis les premiers signes de sa différenciation. Nous verrons également l’état des connaissances actuelles sur le contrôle de la différenciation axonale.

1.3.1 Le développement de l’axone

Après l’ensemencement dans des cultures *in vitro*, les neurones sont de petites sphères symétriques desquelles émergent plusieurs petits prolongements équivalents. La pousse rapide d’un de ces neurites pour devenir l’axone est le signe morphologique d’une brisure de symétrie qui conduira à la polarisation complète de la cellule. *In vivo*, des facteurs extracellulaires influencent cette polarisation (Arimura N, 2007). Cependant, même dans des milieux où l’adhésion et les concentrations en facteurs trophiques sont homogènes, les neurones semblent être de manière intrinsèque capables de décider quel neurite deviendra l’axone. L’une des grandes questions est de savoir comment cette polarité de la cellule s’acquiert. Est-elle prédéterminée ou acquise ?

Les premiers signes

Nous avons vu dans la description de la structure des axones et dendrites que ces deux prolongements possèdent des différences physiologiques et morphologiques. Ainsi, l’axone et les dendrites possèdent des protéines différentes, entre autre dans leur membrane, leur permettant d’assurer leur rôle de pôle émetteur ou récepteur de la cellule. La formation de l’axone nécessite donc des mécanismes de tri des protéines, entre autre membranaires (Burack MA, 2000). Existe-il déjà au stade 2 du développement, les prémices de ce mécanisme de tri sélectif qui déterminerait un neurite à

devenir l'axone ?

La plupart des neurones au stade 3 ont un trafic cytoplasmique polarisé dans leur plus long prolongement (Fig.1.12) (Bradke F, 1997). Les auteurs ont également remarqué qu'une sous population de neurones au stade 2 possédaient eux aussi, déjà, un trafic polarisé dans un ou deux de leur prolongements. Entre autre, les vésicules, mitochondries, ribosomes et protéines membranaires exclusivement localisées dans les dendrites des neurones matures se retrouvent polarisées dans ces prolongements. Ainsi, avant même l'élongation rapide d'un des prolongements qui deviendra l'axone, on retrouve un trafic polarisé dans un ou deux des neurites au stade 2. Lors de l'élongation d'un des prolongements, le mécanisme de tri sélectif n'est pas encore mis en place puisque l'on retrouve des protéines des dendrites matures dans ce prolongement. Ils apparaîtraient donc plus tard dans le développement.

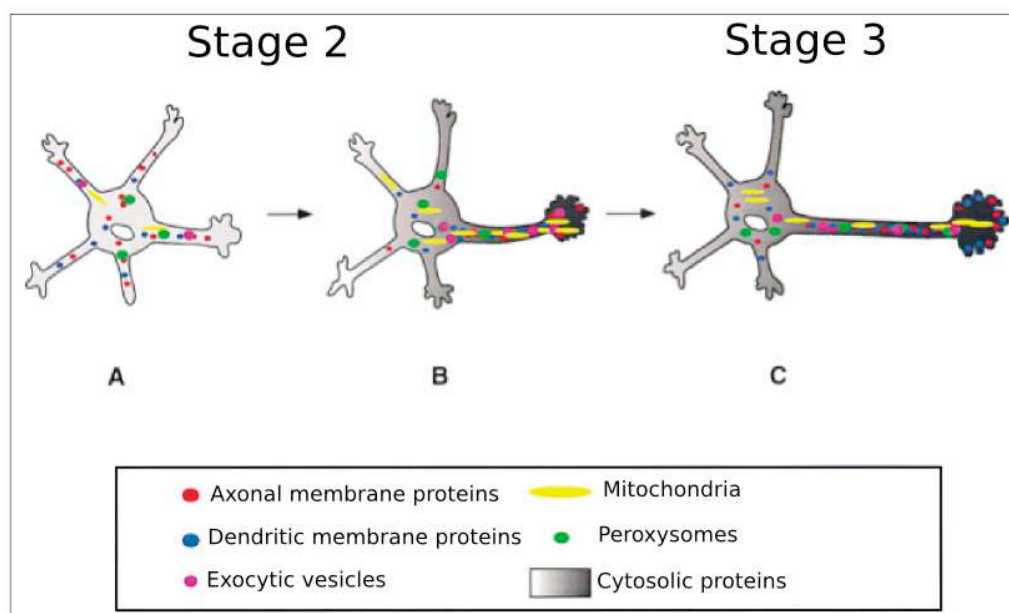


FIGURE 1.12: **Trafic cytoplasmique polarisé durant la différenciation axonale.** (Bradke F, 1997).

De récentes études ont également montré qu'une réorganisation du cytosquelette dans un des prolongements souligne le début de la polarisation axonale (Witte H, 2008a). La dynamique de l'actine joue un rôle important dans le cône de croissance, la formation des neurites et leur élongation. Une des distinctions du cône de croissance du futur axone est la diminution de la stabilité de ses microfilaments d'actine. Cette instabilité pourrait réduire la force s'opposant à l'avancée des microtubules et donc à l'élongation. Il a d'ailleurs été remarqué qu'une dépolymérisation locale des microfilaments d'actine dans un des cônes de croissances des neurites au stade 2 suffit à entraîner

sa différenciation en axone (Bradke F, 1999). La taille du cône de croissance axonal est également plus importante (Bradke F, 1997). Les microtubules jouent eux aussi un rôle actif dans la polarisation axonale. En effet, les microtubules du prolongement qui deviendra l'axone d'un neurone au stade 2 sont plus stables. Une stabilisation des microtubules est d'ailleurs suffisante pour induire la formation de l'axone de neurones d'hippocampes non polarisés (Fig.1.13) (Witte H, 2008b). Cette stabilisation des microtubules dans un des prolongements pourrait entraîner un transport sélectif vers ce neurite, renforçant ainsi la pousse axonale. En effet, certains moteurs moléculaires, comme la kinésine, montrent plus d'affinités pour les microtubules stables (Reed NA, 2006). D'ailleurs, la kinésine, qui transporte des vésicules vers le bout + des microtubules, est sur-exprimée dans l'axone (Jacobson C, 2006).

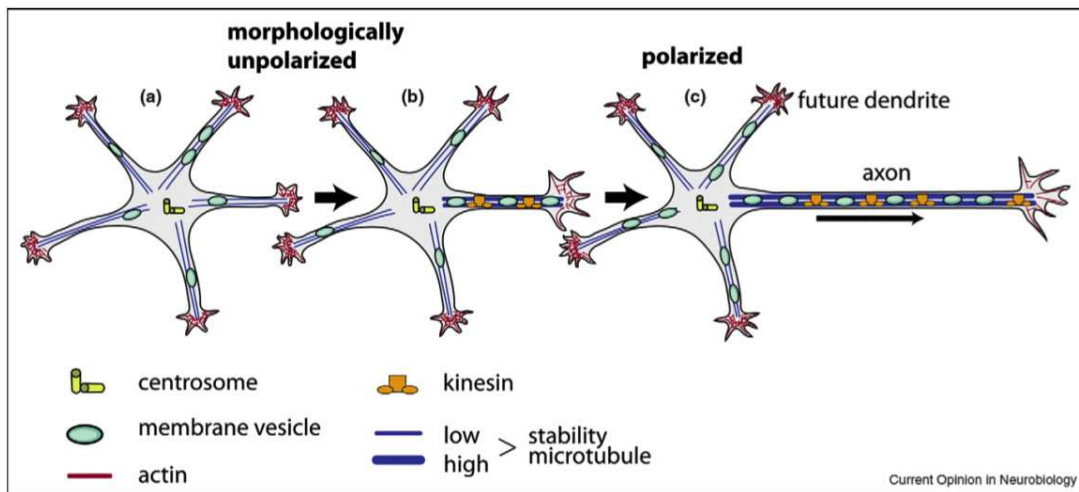


FIGURE 1.13: Réorganisation du cytosquelette lors de l'apparition de la polarité. Diminution de la stabilité des microfilaments d'actine dans le cône de croissance et stabilisation des microtubules. (Witte H, 2008a).

Les organites cellulaires et leur rôle dans la différenciation

Nous venons de voir que la dynamique des microtubules joue un rôle prépondérant dans la polarisation axonale. Il est donc légitime de se demander si leur centre organisateur, le centrosome, y joue également un rôle important. Il a été montré dans les neurones d'hippocampe de rat que le centrosome se positionne, dans les premiers stades de développement du neurone, en face du neurite qui deviendra l'axone (Fig 1.14) (de Anda FC, 2005). Dans les cellules granulaires du cervelet, le centrosome ainsi que l'appareil de Golgi se retrouvent également à la base de l'axone au moment de son émergence (Zmuda JF, 1998). Cette position de l'appareil de Golgi et du

centrosome en face de l'axone émergent pourrait faciliter la délivrance des microtubules ainsi que des vésicules sécrétées contenant les protéines nécessaires à son élongation. Cependant, le fait que le centrosome et l'appareil de Golgi se trouvent à la base de l'axone n'est pas général pour tous les types de neurones (Hayashi K, 2003). Une des questions que l'on se pose alors est de savoir si

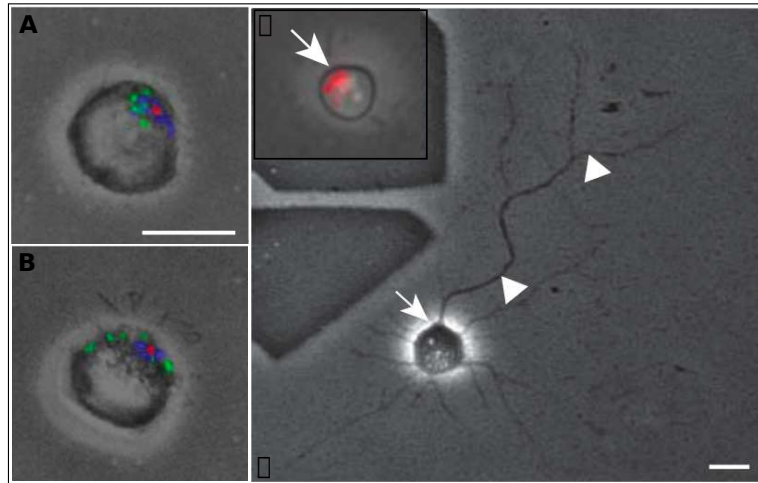


FIGURE 1.14: **Le centrosome se positionne, dans les premiers stades du développement du neurone, en face du neurite qui deviendra l'axone** (de Anda FC, 2005). A/ et B/ Le centrosome (rouge), l'appareil de Golgi (bleu) et les endosomes (vert) sont polarisés dans les cellules lors de l'ensemencement (A), et à la base de l'émergence du premier lamellipode (B). La barre d'échelle représente $10\mu\text{m}$. C/ et D/ Appareil de Golgi (rouge, C) avant et après polarisation du neurone. Celui-ci est positionné avant polarisation à l'endroit où émerge l'axone. La flèche indique la position de l'appareil de Golgi avant polarisation. La barre d'échelle représente $10\mu\text{m}$.

la position du centrosome implique la position de l'axone ou si la position du centrosome en face de l'axone en est une conséquence. Dans les cellules granulaires du cervelet, le centrosome ainsi que l'appareil de Golgi se retrouvent à la base du premier axone émergent et se déplacent vers le second axone après son émergence (Zmuda JF, 1998). Comme cette réorientation apparaît après que le second axone ait émergé, elle pourrait donc être une conséquence de l'apparition du nouvel axone. Les auteurs suggèrent d'ailleurs que les forces générées par le cône de croissance pourraient indirectement affecter la localisation du centrosome et de l'appareil de Golgi. Toujours dans ces cellules granulaires, l'initiation du second axone peut être empêchée par la dépolymérisation des microfilaments d'actine, qui résulte en une position aléatoire du centrosome. Cependant, si le prolongement a déjà commencé à s'allonger, il continue son élongation. Les auteurs en déduisent qu'une position du centrosome non aléatoire est nécessaire uniquement pour initier le second axone.

Il est également instructif de regarder le mouvement du centrosome dans les neurones mi-

grants bipolaires lors de l'émergence de chacune des neurites (Higginbotham HR, 2007). Lorsque ces neurones rencontrent une source de molécules répulsives, ils se réorientent en rétractant leur prolongement se trouvant face à la source (prolongement leader) et étendent un autre prolongement dans la direction opposée. Le centrosome se réoriente en face du nouveau prolongement seulement une fois que celui-ci a commencé à émerger. Cela suggère que la position du centrosome ne détermine pas la position du prolongement émergent. Cependant, cette réorientation du centrosome pourrait être impliquée dans la stabilisation de ce nouveau prolongement. En effet, lorsque l'on bloque la réorientation du centrosome, le nouveau prolongement émergent n'est pas stable, et les neurones échouent dans leur réorientation. Notons que les microtubules du prolongement leader sont tous orientés, comme dans l'axone, avec leur bout + dirigés vers l'extrémité de celui-ci (Vallee RB, 2009).

Ainsi, le centrosome semble jouer un rôle lors de l'élongation et de la stabilisation d'un prolongement leader de neurone migrant. Cela pourrait expliquer pourquoi il se trouve à la base de l'axone, nécessitant un apport de matière conséquent pour sa rapide élongation. Cependant, cette position ne semble pas être nécessaire pendant toute la durée du développement de ce prolongement.

Une polarisation réversible *in vitro*

Des études sur les neurones d'hippocampe ou corticaux au stade 3 ont révélé leur capacité à changer une future dendrite en un axone si l'on coupe l'axone près du corps cellulaire (Bradke F, 2000). Cela indique que tous les neurites ont la capacité de devenir des axones. Cette capacité est encore présente même si le neurone est mature et a créé des contacts synaptiques (Gomis-Rüth S, 2008). Une dendrite mature peut alors se transformer en axone. Il existe une longueur critique d'environ 35 μm aussi bien pour les neurones au stade 3 que matures au dessus de laquelle l'axone repart au même endroit en cas de coupure, comme si le prolongement avait gardé une sorte de repère pour repousser. Les auteurs suggèrent que ce repère pourrait être les microtubules stabilisés que l'on retrouve dans la partie distale de l'axone. S'ils sont encore présent après la coupure, ils enclenchent la repousse de l'axone. Au contraire, si l'on coupe trop près du corps cellulaire, la compétition entre les différents prolongements pour devenir l'axone recommence, et souvent, une dendrite devient axone. Ces microtubules stables pourraient être le signal pour que les kinésines spécifiques de l'axone transportent le matériel nécessaire pour que le prolongement redevienne l'axone. Ainsi, la pousse du nouvel axone pourrait être lié au transport de vésicules spécifiquement

axonales. D'ailleurs, la stabilisation des microtubules induite pharmacologiquement provoque le changement de dendrites matures en axone (Gomis-Rüth S, 2008).

1.3.2 La mécanique de l'axone

Observations : la tension dans les neurites et son rôle dans la différenciation axonale

Depuis plus d'une trentaine d'années, les chercheurs se sont intéressés au rôle de la tension dans l'élongation et la rétractation des neurites. Il a été montré de manière indirecte que les neurites des neurones en culture sont sous tension induite par les cônes de croissance en observant par exemple leur géométrie (Fig. 1.15) (D, 1979) (Condron BG, 1997). Il a été en effet remarqué que les géométries des prolongements des neurones correspondaient à celles d'un réseau mis sous tension à ses extrémités libres[†].

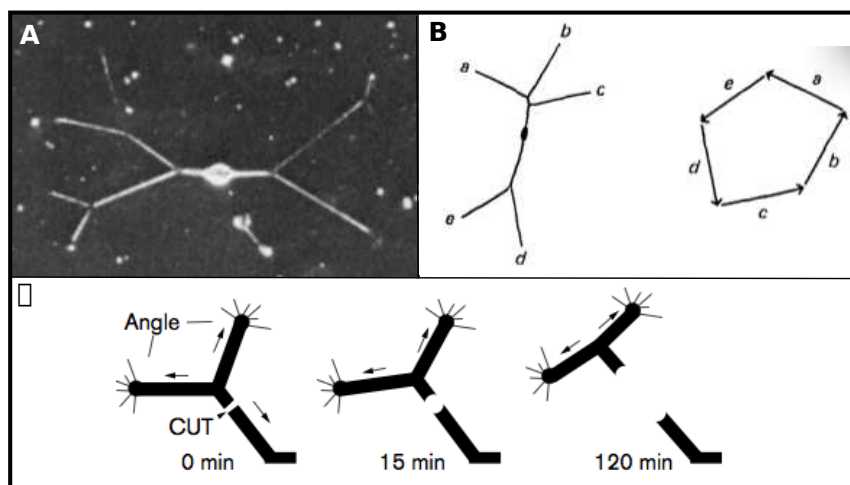


FIGURE 1.15: **Tension des neurites mise en évidence par l'analyse de la géométrie des prolongements des neurones.** A/ Neurone sensoriel en microscopie électronique (X210). B/ Squelette d'un neurone (à gauche) et Polygone des forces (à droite) construit en prenant un vecteur unité pour chaque extrémité de prolongement, avec l'orientation de chacun d'eux (D, 1979). C/ Schéma d'un neurone avec ses trois branchements. La géométrie change conformément à l'existence de tensions exercées aux extrémités par les cônes de croissance lors du sectionnement de l'un deux (Condron BG, 1997).

[†]. Dans une publications de 1979, l'auteur analyse les géométries de différents neurones et assimile le neurite à une corde sur laquelle est exercée une force de tension au niveau de son extrémité libre. Il montre alors que la plupart des neurones sont à l'équilibre mécanique et peuvent transiter d'un état d'équilibre à un autre. Si l'on coupe une des neurites, s'ensuit la création de branchements qui permettent de rétablir l'équilibre.

La mesure effective de la tension de neurites a été directement effectuée sur des cellules PC12[‡], en appliquant une force perpendiculaire à chaque neurite (Fig. 1.16) (Dennerll TJ, 1988). Les auteurs trouvent une relation linéaire entre la tension mesurée et le changement de longueur du neurite lors de la mesure. Ils assimilent donc le neurite à un ressort et déterminent sa constante ainsi que la tension sans changement de longueur (donc sans application de force). La plupart des neurites ont une tension comprise entre 200 et 400 pN mais ces valeurs peuvent varier entre 0 et 10 000pN.

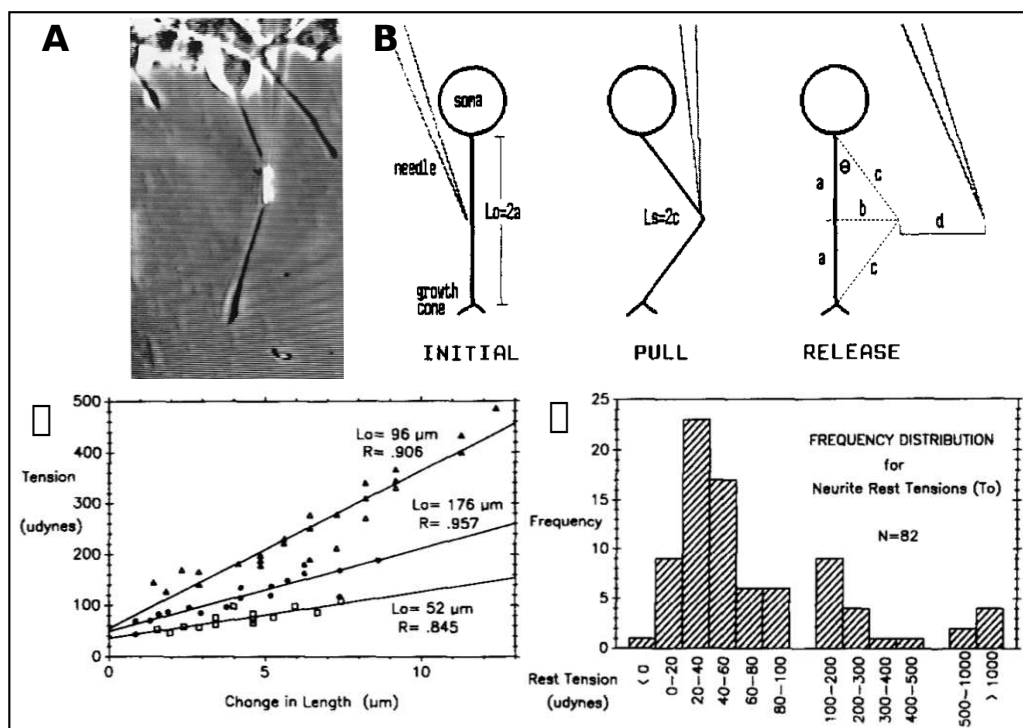


FIGURE 1.16: **Mesure effective de la tension des neurites par déplacement latéral.** A/ Application d'une force perpendiculaire sur un neurite de cellule PC12. B/ Méthode de mesure de la tension. L_0 : longueur au repos, b : déplacement latéral de la neurite, d : déflexion de la micropipette, proportionnelle à la force appliquée sur le neurite. C/ Diagramme de la tension mesurée en fonction du changement de longueur du neurite pour trois neurites différents. Pour chaque courbe, la pente représente la constante du ressort et l'intersection avec les ordonnées la tension du neurite sans déplacement (tension au repos, T_0) D/ Distribution des tensions des neurites au repos (Dennerll TJ, 1988).

Récemment, il a même été montré qu'il était possible d'induire une différenciation axonale par l'application d'une tension extérieure, indiquant que le dépassement d'un seuil de tension serait

[‡]. Lignée cellulaire dérivée de pheochromocytoma (cancer à l'interface du système hormonal et du système nerveux) de la médulla surrénale (partie interne de la glande surrénale) d'un rat. Les cellules PC12 cessent de se diviser et se différencient lorsqu'elles sont traitées avec du facteur de croissance neural. Elles sont très utilisées en tant que modèles pour la différenciation neuronale ou pour l'étude de la mécanique des neurites.

suffisant à induire une différenciation axonale. En effet, Lamoureux et al. ont appliqué une tension extérieure comprise entre 200 et 1000 pN à des neurites au stade 2 et au stade 3 de développement (Fig. 1.17)(Lamoureux P, 2002). Ces neurites s'allongent alors avec une vitesse pouvant atteindre $140\mu\text{m}/\text{h}$ et se différencient en axone (Dans le cas du neurone en stade 3, cette neurite forme donc un second axone). Chaque neurite montre une réponse linéaire de la vitesse d'élongation en fonction de la tension extérieure appliquée. Cette tension extérieure appliquée est de l'ordre de 10 fois la force développée par un lamellipode *in vitro*.

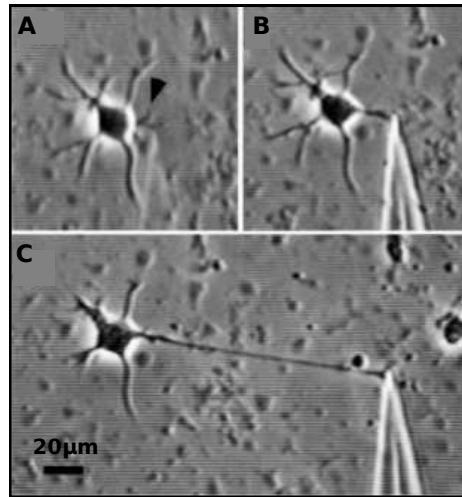


FIGURE 1.17: Elongation d'un neurite induite par l'application d'une tension extérieure sur un neurone de stade 2. A/ Neurone avant l'application de la pipette. B/ Neurone 30 min après, au début de l'application de la tension extérieure. C/ Neurone 5h40 après l'image B, à la fin de l'application de la tension extérieure. (Lamoureux P, 2002).

Une seconde équipe s'est attachée à connaître la tension seuil à partir de laquelle un neurite s'initie à l'aide de microbilles magnétiques, ayant une meilleure précision que les micropipettes (Fass JN, 2003). La probabilité d'initier un neurite augmente nettement pour des forces variants de 100 à 450 pN, avec un optimum pour 450pN. Il serait intéressant d'utiliser cette technologie pour trouver le seuil de tension à partir duquel un neurite se différencie en axone. Cependant, de façon surprenante, l'application d'une drogue, la cytochalasin E, supprimant la motilité du cône de croissance, n'empêche pas la différenciation axonale d'un neurone d'hippocampe de rat (Ruthel G, 2000). Ainsi, même en l'absence des forces créées par le cône de croissance, un neurite arrive à se différencier.

La génération de forces dans l'axone : un point de vue biologique

Comment le futur axone arrive-t-il concrètement à exercer des forces pour s'allonger ou se rétracter ? Deux grandes opinions sur la génération de forces dans l'axone s'affrontent. La première, et plus ancienne propose que les avancées et rétractations de l'axone impliquent une polymérisation et dépolymérisation du cytosquelette. Une autre piste implique quant à elle le rôle des moteurs moléculaires dans la génération de forces sur le cytosquelette qui affecteraient alors sa configuration (Baas PW, 2001).

Des études ont en effet impliqué le rôle de moteurs moléculaires dans l'élongation et la rétraction de l'axone. La dynéine par exemple a été impliquée dans le transport antérograde de microtubules dans l'axone. Cette étude suggère que le domaine cargo de la dynéine s'associe avec l'actine corticale, laissant le domaine moteur libre pour transporter les microtubules. Ainsi, les microfilaments d'actine et les microtubules seraient liés par des forces induites par la dynéine. D'ailleurs, l'inhibition de la dynéine empêche le transport des microtubules et la pousse axonale. Aucune dépolymérisation notable des microtubules n'a été remarquée lors de cette inhibition mais les microtubules glissent de façon rétrograde sous le flux rétrograde d'actine dans le cône de croissance. (Grabham PW., 2007). Des études ont également montré que l'axone peut se développer même lorsque l'assemblage et le désassemblage des microtubules sont supprimés (Baas PW, 1993). La myosine II a également été impliquée comme lien entre les forces développées dans le cône de croissance et le corps du neurite, comme expliqué dans la partie 1.2.2 à la page 25. Il semble donc que les moteurs moléculaires puissent faire le lien entre l'actine et les microtubules afin de générer des forces en réorganisant le cytosquelette. Des études pharmacologiques vont également dans ce sens (Fig.1.18) (Baas PW, 2001).

Lorsque les microtubules sont pharmacologiquement dépolymérisés, l'axone se rétracte, devient plus fin et des renflements en forme de bille se développent (Fig.1.18/b). Ces renflements sont des zones peu riches en microtubules. Il semble donc que les microtubules supportent une certaine tension puisqu'en l'absence de ceux-ci, une rétractation se produit. La question est alors de savoir qui exerce cette tension. Une dépolymérisation de l'actine en supplément n'entraîne aucune rétraction mais l'axone prend le même aspect fin et renflé (Fig.1.18/c). Cela indiquerait alors que les microtubules sont compressés par les filaments d'actine. Une étude supplémentaire va également dans le sens d'une tension exercée par le réseau d'actine puisque la stimulation de la polymérisation de l'actine par l'injection de phalloïdine provoque la rétraction des neurites (Dennerll TJ, 1988). Les moteurs moléculaires sont-ils impliqués dans cette génération de contractilité ? L'inhibition de

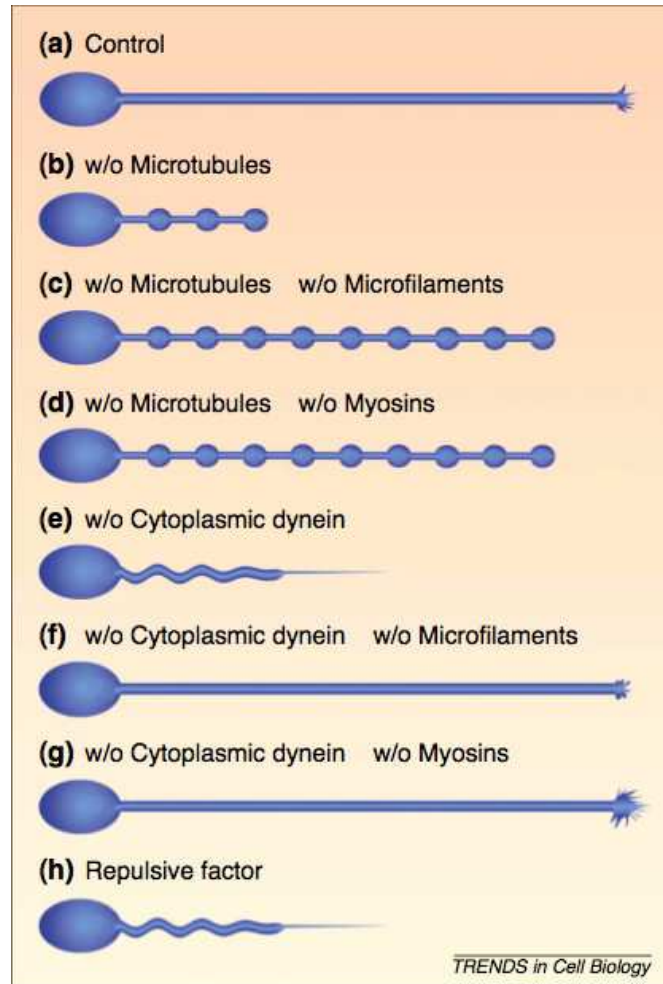


FIGURE 1.18: Schéma de la réponse de l'axone à la dépolymérisation des éléments du cytosquelette, ou à l'inhibition de certains moteurs moléculaires (Baas PW, 2001).

la myosin II ajoutée à la dépolymérisation des microtubules provoque le même effet qu'une dépolymérisation de l'actine (Fig.1.18/c). Son inhibition découplerait donc les forces exercées entre les microfilaments d'actine et les microtubules. La compression serait donc due à une contractibilité acto-myosine.

Si la dynéine est maintenant inhibée, l'axone se rétracte mais ne devient pas plus fin ni ne présente des renflements en forme de bille (Fig.1.18/e). Il adopte plutôt une forme sinusoïdale, laissant lors de sa rétractation une traînée derrière lui. Ainsi, l'inhibition de la dynéine enlèverait la capacité du réseau microtubulaire à résister à la compression du réseau d'acto-myosine. D'ailleurs, comme précisé plus haut, l'inhibition de la dynéine entraîne le glissement rétrograde des microtubules sous le flux rétrograde d'actine au niveau du cône de croissance. En contrôle, l'ajout d'une

dépolymérisation des microfilaments n'entraîne aucune rétraction, puisque le neurite n'est plus soumis à la moindre compression (Fig.1.18/f). Une inhibition de la myosine parallèlement à la dynéine produit le même effet, conformément à ce qui est attendu (Fig.1.18/g). Ainsi, la dynéine et la myosine II semblent être impliquées dans les générations de force sur le cytosquelette.

La génération de forces dans l'axone : des mesures et des modèles physiques

En se basant sur le comportement de l'axone lors de la dépolymérisation des éléments du cytosquelette présentés dans le paragraphe précédent, des modèles physiques ont été avancés. L'un d'eux se base sur la tenségrité : faculté d'un système à se stabiliser par le jeu de forces de tension (continues) et de compression (discontinues) qui s'y répartissent et s'y équilibrent. Dans ce modèle les microtubules et microfilaments sont comparés aux composants supportant la tension et la compression d'une structure statique régie par la tenségrité. Ainsi, le réseau de microfilaments d'actine est sous tension structurale pendant que les microtubules supportent cette tension et sont donc sous compression (Dennerll TJ, 1988). Ce modèle est en accord avec les études présentées dans le paragraphe précédent qui montrent que lorsqu'on dépolymérise pharmacologiquement les microtubules, l'axone se rétracte mais pas si l'actine l'est également (Fig.1.18/b et c).

Des expériences ont également été réalisées pour essayer de déterminer les propriétés mécaniques de l'axone. Des études sur la réponse élastique et la dissipation visqueuse de l'axone ont été menées en prenant comme modèle des neurites de cellules PC12. Sous l'application de forces extérieures, des mesures ont été réalisées sur les déformations induites et le comportement du neurite (Bernal R, 2007), (Dennerll T, 1989), (O'Toole M, 2008). Il a été montré qu'un neurite a un comportement viscoélastique, c'est à dire qu'il se comporte à la fois comme un fluide visqueux (montrant une résistance caractéristique au mouvement, la viscosité, qui résulte en une perte d'énergie par friction se dissipant dans le fluide) et comme un solide élastique (sous l'application d'une force, sa déformation est instantanée, constante, et totalement réversible, comme un ressort par exemple.). La réponse d'un neurite dépend du temps d'observation. Des déformations rapides durant des périodes de l'ordre de la seconde à la minute mènent à un comportement élastique. Cependant, quand les neurites sont tirées suffisamment lentement pendant des heures voire des jours, ils peuvent s'allonger avec un comportement visqueux sur plusieurs millimètres sans rompre ni s'amincir. Le fait que l'allongement puisse se faire sans amincissement montre qu'il y a apport de matière. L'élongation du neurite en réponse à une force appliquée peut être découpée en trois phases. Après un étirement élastique, il y a une période de repos, puis une élongation à taux

constant.

De nombreux modèles physiques modélisent cette élongation et ce comportement viscoélastique, notamment en utilisant des éléments classiques de comportement élastiques (les ressorts) avec des éléments de comportements visqueux (les amortisseurs : qui résistent au mouvement par des frictions visqueuses. Les modèles contenant des amortisseurs ajoutent un élément visqueux dépendant du temps) (Dennerll T, 1989). Ces modèles physiques ont pour avantage de pouvoir déterminer quelles propriétés simples de l'axone expliquent le comportement observé *in vitro*. En effet, chaque modèle prend en compte une quantité finie de propriétés de l'axone, et détermine comment celui-ci réagirait avec uniquement ces propriétés. Ainsi, il est possible de comparer les résultats du modèle à la réponse réelle d'un axone et de déterminer quels comportements ces propriétés permettent d'expliquer, et ceux qu'elles ne peuvent pas.

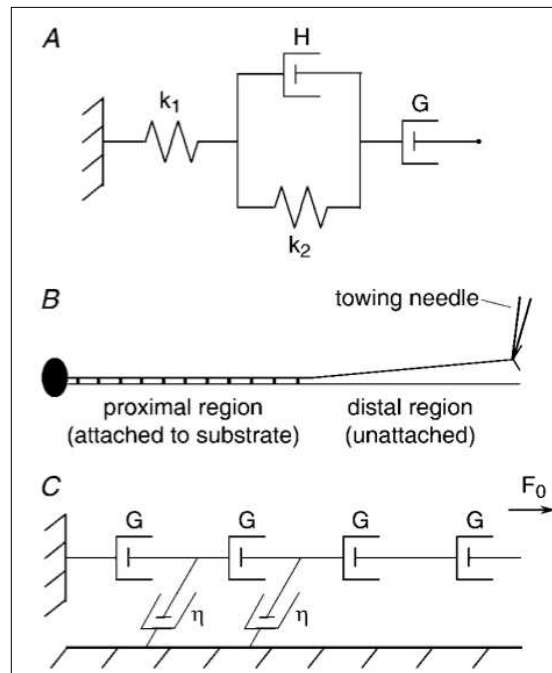


FIGURE 1.19: Modèle prenant en compte l'adhésion de l'axone : Modélisation d'un neurite sous exercice d'une tension extérieure comme une série d'éléments de Burger (O'Toole M, 2008). A/ Schéma d'un élément de Burger, composé de deux ressorts et de deux amortisseurs en série ou en parallèle. B/ Schéma d'un neurite durant l'exercice d'une tension extérieure à son extrémité. La partie distale n'est pas adhésive. Dans la région proximale, de nombreux points d'adhésions permettent au neurite de rester bien fixé. C/ Modélisation du neurite sous application d'une force extérieure F_0 . Sous application de tension constante, les éléments de Burger se comportent comme leur amortisseur libre. Les points d'adhésion au substrat sont modélisés par des amortisseurs de constante η . La tension est donc constante dans la partie distale mais est dissipée dans la partie proximale de l'axone.

Ainsi, le modèle de Bernal et al. par exemple, tient compte non seulement des propriétés viscoélastiques de l'axone mais également de sa capacité à générer des forces de tension contractiles grâce à ses moteurs moléculaires (Bernal R, 2007). Récemment, les modèles physiques s'intéressent à l'adhésion du neurite, et aux propriétés qu'elles lui confèrent. Un premier modèle introduit par exemple le fait que le neurite puisse adhérer, en disposant des points d'adhésions le long du neurite. Cela expliquerait le fait que la tension développée par le cône de croissance est atténuée (Fig.1.19) (O'Toole M, 2008). Le modèle de Chan quant à lui, modélise ces points d'adhésion appelés 'clutches', interaction entre le substrat et les microfilaments d'actine.

1.3.3 Le guidage de l'axone *in vitro*

Cette dernière partie sur l'axone s'attache à décrire l'état actuel des connaissances mises en oeuvre pour pouvoir guider l'axone dans une culture *in vitro* ainsi que leur limites. Nous verrons dans un premier temps que des molécules attractives ou répulsives pour l'axone *in vivo* peuvent être utilisées *in vitro* pour guider l'axone. Un second paragraphe abordera les expériences réalisées utilisant des différences d'adhésion. Enfin, une dernière partie décrira les techniques physiques récemment utilisées pour guider l'axone.

Des molécules attractives et répulsives

Lors du développement du cerveau, les précurseurs neuronaux vont migrer vers leur destination finale et fonctionnelle. Cette migration neuronale n'est pas réduite aux embryons mais on la retrouve également dans les cerveaux de nouveaux nés et d'adultes. Une fois à leur emplacement, les neurones vont également se connecter de manière adéquate pour former ces architectures fonctionnelles qui permettront de traiter correctement les informations. Dans la migration neuronale comme dans la guidance de l'axone vers les zones cibles, des molécules attractives et répulsives sont impliquées. Certaines molécules peuvent même être attractives dans certaines zones du cerveau et répulsives dans d'autres! Ces dernières années, de gros progrès ont été réalisés dans la connaissance de ces molécules en les plaçant dans des cultures *in vitro* et en observant le comportement des neurones à leur contact (Park HT, 2002) (Arimura N, 2007). La protéine Slit, par exemple, est répulsive alors que la Netrin peut être soit attractive soit répulsive pour les axones. Des molécules de la famille des semaphorin ont été également impliquées dans ces phénomènes de guidance. La semaphorine 3A est répulsive pour l'axone mais est une molécule attractive pour les dendrites des neurones corticaux. Ces molécules sont captées par les récepteurs membranaires des

cellules et s'ensuit toute une cascade de signaux intracellulaires qui pourraient soit réorganiser le cytosquelette ou organiser la délivrance de vésicules dans un des neurites. La connaissance de ces molécules et des mécanismes qu'elles induisent dans le cône de croissance peut être utilisée pour guider les axones *in vitro* (Lin AC, 2007) (Wen Z, 2004) (Buck KB, 2002). Des molécules peuvent en effet être photoactivées localement par l'application d'un rayonnement laser. Cependant, le potentiel d'une telle technique reste limité. En effet, le largage de la molécule à l'endroit désiré peut influencer plusieurs neurones à la fois et il est impossible de limiter sa diffusion dans tout le milieu. Ainsi, elle ne peut être utilisée que pour un contrôle global de la direction de pousse des axones de neurones en culture *in vitro*.

Une adhésion différente

Un contrôle de la différenciation axonale peut également être réalisé en jouant sur des adhésions différentes. Il a en effet été montré avec des neurones d'hippocampe de rat qu'il était possible de contrôler la pousse axonale *in vitro* en utilisant des molécules connues pour promouvoir la pousse axonale *in vivo* : la laminin ou NgCAM . Lemmon et al ont en effet montré qu'en cultivant des neurones sur des bandes de molécules d'adhésion différentes : polylysine et laminin ou polylysine et NgCAM, le premier neurite rencontrant la frontière se différencie en axone (Esch T, 1999). De même, en créant des gradients de laminin, il est possible d'orienter la pousse axonale. L'axone s'oriente alors vers la densité de surface de laminin la plus élevée (Dertinger S, 2002). Ainsi, un changement local d'adhésion peut entraîner une différenciation axonale. Etant donné que l'adhésion est intimement liée au cytosquelette, on peut alors se demander si ces changements d'adhésion ne seraient pas reliés à des changements locaux de tension, induite par une réorganisation du cytosquelette.

Des champs de forces

Plusieurs techniques physiques ont été mises en oeuvre pour tenter d'orienter l'axone mais pour l'instant, elles apportent plus de questions que de réponses. Le cône de croissance de l'axone peut être par exemple guidé par de faibles forces optiques. (Ehrlicher A, 2007) En effet, lorsque l'on focalise un laser devant une aire spécifique du cône de croissance, celui-ci tourne et pousse plus rapidement.

Il a été également montré que l'application de champs électriques constants (DC) et alternatif (AC) de l'ordre de 10 à 100 mV/mm peuvent orienter la pousse neuritique (Fig.1.20) (McCaig CD,

2005). En effet les cônes de croissance peuvent être soit attirés soit repoussés par la cathode, dépendants du type de neurone, du substrat (adhésion et charge) et du type de prolongement (axone ou dendrite). Avec des champs électrique DC, les cônes de croissances changent leur direction de migration en fonction de l'adhésion au substrat et de sa charge. Les neurones sensitifs ne tournent pas vers la cathode contrairement aux moto-neurones. Chez des neurones d'hippocampe de rat, les dendrites sont attirées vers la cathode, alors que les axones ne tournent pas en direction de celle-ci. Les neurites de cellules PC12 peuvent être orientés par un champs magnétique statique ou pulsé (Kim S, 2008). Les neurites s'orientent alors perpendiculairement au champs. Cependant, il n'a pas été remarqué de différences entre le comportement de l'axone et des dendrites.

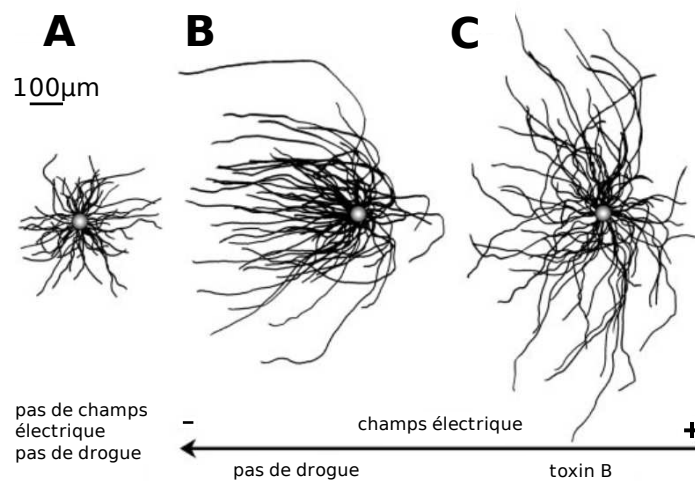


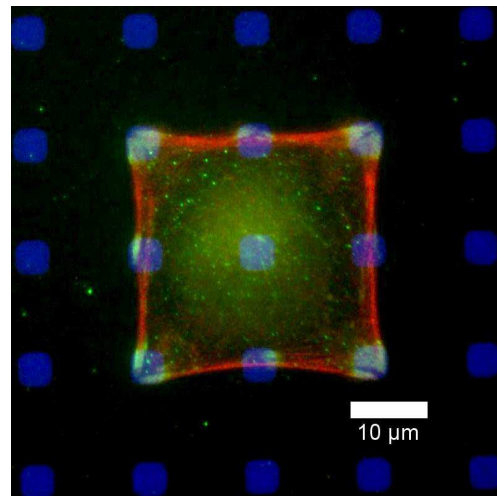
FIGURE 1.20: **Neurone de Xenope exposé à un champs électrique DC.** A/ Cellule en l'absence de champs électrique et de drogue. Les neurites poussent aléatoirement dans toutes les directions. B/ Cellule en présence d'un champ électrique de 150 mV/mm. Les neurites poussent vers la cathode. La vitesse de pousse est plus rapide vers la cathode. C/ Inhibition des protéines de la familles Rho avec la toxine B. Les neurites poussent alors aléatoirement dans toutes les directions, en présence du même champs électrique (McCaig CD, 2005).

Le lien entre l'application de champs électrique ou de force optique et la réorganisation du cytosquelette ou la cascade de signaux intracellulaires menant à un changement de direction n'est pas encore élucidé. Cependant, on commence à connaître, grâce à des études pharmacologiques, quelques protéines sans l'action desquelles la cellule n'est plus sensible au champs électrique (Fig 1.20/C).

Chapitre 2

Des Cellules sur micropattern

L'un des principaux défis des études sur le vivant est de prouver la reproductibilité des résultats obtenus. Ces dernières années, des techniques physiques se sont introduites dans les expériences de biologie, afin de contrôler le plus de paramètres expérimentaux possibles. Ainsi, afin de pouvoir comparer dynamiquement le développement des différentes cellules mises en culture, Bruckert et al. ont mis au point une technique permettant de faire adhérer simultanément les cellules lors de leur ensemencement.



Les cellules sont maintenues en suspension par des forces électrostatiques à une même distance du substrat, puis relâchées en même temps (Socol M, 2008). Des techniques de micropatterning se sont également développées dans les années 90. Dans ce cas, le procédé est différent. Il consiste à contrôler spatialement les cellules en culture *in vitro*. Ainsi, il est par exemple possible de placer un nombre important de cellules dans un même état d'adhésion et de géométrie afin d'avoir des statistiques solides.

Nous verrons dans ce chapitre le principe de ces substrats micropatternés, les différentes techniques utilisées pour les réaliser ainsi que les différents types d'études et de résultats novateurs que de tels substrats ont pu permettre. L'utilité des micropatterns pour l'étude des réseaux de neurones sera ensuite exposée.

Sommaire

2.1	Substrats micropatternés : du principe à la pratique	47
2.1.1	Le Principe	47
2.1.2	Définir les zones adhésives	48
2.1.3	Applications	51
2.2	Des neurones sur patterns	55
2.2.1	Des réseaux de neurones à architecture contrôlée	55
2.2.2	Contrôler la polarisation axonale avec des micropatterns	59

2.1 Substrats micropatternés : du principe à la pratique

Les techniques de microfabrication combinées à une chimie de surface et à la science des matériaux ont procuré de nouveaux outils pour explorer *in vitro* les interactions entre les cellules et leur environnement. Elles permettent entre autre de contrôler l'adhésion cellulaire, les propriétés physiques du substrat ou la forme des cellules. Nous aborderons tout d'abord dans cette partie le principe des substrats micropatternés ainsi que les techniques employées pour les créer. Les applications possibles de l'utilisation de tels substrats seront ensuite détaillées.

2.1.1 Le Principe

Les substrats micropatternés permettent de contrôler spatialement les cellules en culture. Ce contrôle est réalisé grâce à un contraste d'adhésion cellulaire. Le substrat possède en effet des zones permissives où la cellule peut adhérer et des zones où elle ne le peut pas. Ainsi, en contrôlant les positions des zones adhésives, il est possible de contrôler l'emplacement des cellules (Fig.2.1). Cela permettra par exemple de mettre en place des techniques de criblages. Il est également possible, selon la géométrie de chaque spot d'adhésion, de faire adopter des formes précises aux cellules, qu'elles soit isolées ou en structures multicellulaires. Des chemins d'adhésion peuvent aussi être créés afin de faciliter l'étude de la migration cellulaire.

Enfin, en modifiant la topographie et les propriétés de la surface (hydrophobicité, charge, ru-

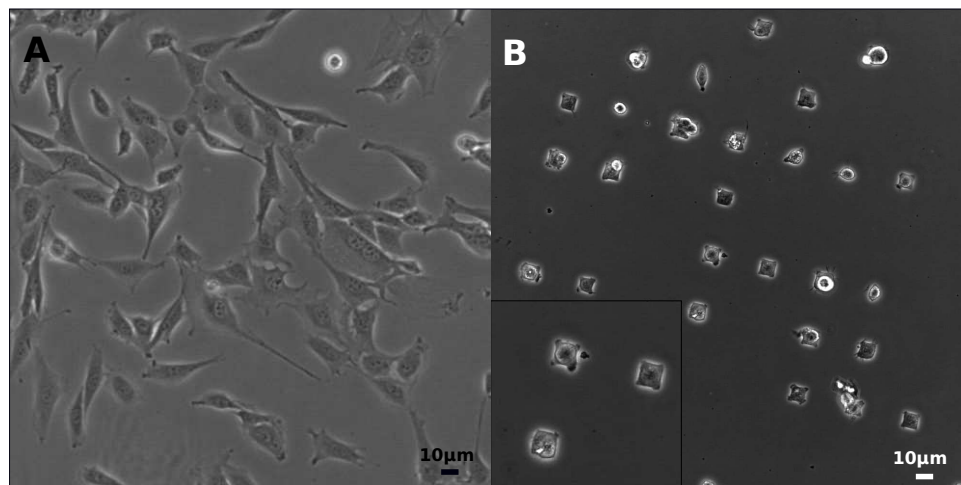


FIGURE 2.1: **Contrôle spatial des cellules en culture.** A/ Image en contraste de phase de fibroblastes NIH/3T3 en culture *in vitro* sur un substrat homogène. B/ Image en contraste de phase de fibroblastes NIH/3T3 en culture sur micropatterns (Avec l'accord de Benoît Vianay, Institut Néel).

gosité..), des conditions d'adhésions différentes peuvent être réalisées afin d'étudier leur impact sur les fonctions de la cellule. Les études rendues possibles sont multiples selon les applications souhaitées. Tout repose alors sur l'ingéniosité de l'expérimentateur dans le choix de la géométrie du pattern.

2.1.2 Définir les zones adhésives

Pour définir les zones adhésives, plusieurs techniques venant de la micro-électronique sont utilisées, et détaillées dans la revue citée (Falconnet D *et al.* , 2006). Nous ne détaillerons dans cette partie que les deux techniques les plus répandues pour créer des micropatterns : la lithographie souple et la photolithographie.

La lithographie souple

La lithographie souple est utilisée couramment pour créer des substrats à contraste d'adhésion. Ce nom désigne un ensemble de techniques utilisant à une certaine étape de leur procédé un élastomère, d'où l'appellation de 'souple'. Nous aborderons ici la technique la plus couramment utilisée : le microcontact printing (μ CP).

Le μ CP est la technique la plus communément utilisée par les biologistes. La popularité de cette technique vient de sa simplicité, son coût réduit et son adaptation possible à tous les types de substrats. Les étapes du procédé sont détaillées dans la figure 2.2. La première étape consiste à créer un 'tampon' en coulant un polymère en phase liquide dans un moule microstructuré (Fig 2.2/A-a) *. Après un recuit permettant de durcir le polymère, le tampon est retiré du moule (Fig 2.2/A-b et c). L'étape suivante consiste à imprégner le tampon de l'encre désirée (Fig 2.2/B-a). Cette encre est en fait une solution des molécules à micropatternner. Le tampon est ensuite appliqué sur la surface afin de transférer l'encre sur le substrat (Fig 2.2/B-b et c). Une éventuelle dernière étape consiste à remplir les zones vierges du substrat avec une seconde molécule (Fig 2.2/B-d).

En général, la création du moule est réalisée en salle blanche grâce à des techniques de photolithographie (voir paragraphe suivant). Le design de ce moule microstructuré est l'étape critique de cette technique puisque le succès du μ CP dépend fortement des propriétés mécaniques du tampon. Le tampon doit être en effet suffisamment souple pour pouvoir s'adapter élastiquement afin de remplir les trous laissés par la rugosité naturelle du substrat. Il doit être également assez dur pour

*. Le polymère le plus utilisé en tant que tampon est le poly(diméthylsiloxane) (PDMS) bien que la possibilité d'utiliser d'autres siloxanes ait été prouvée

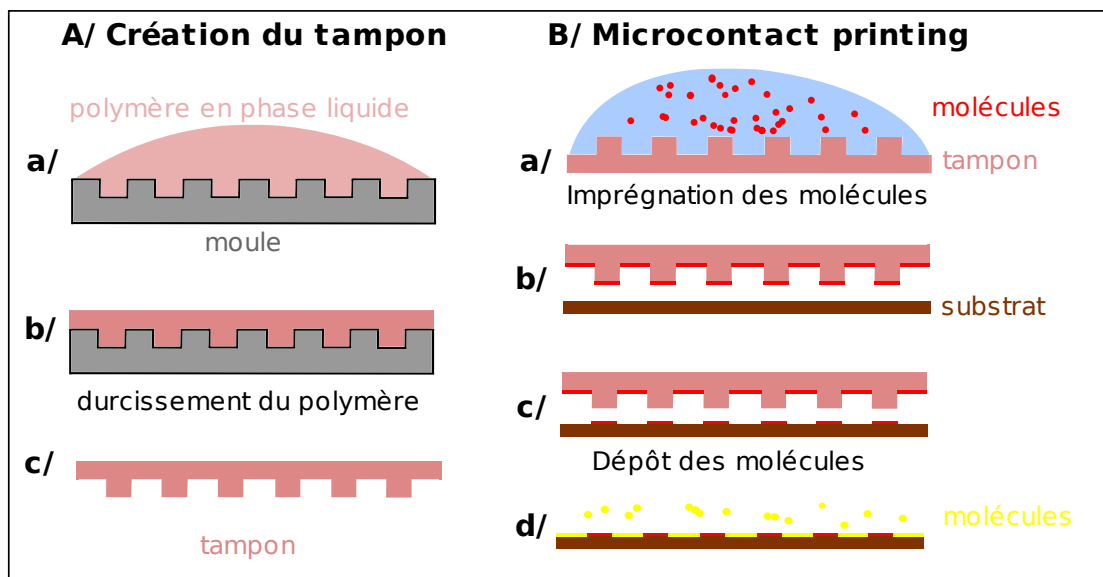


FIGURE 2.2: Représentation schématique des méthodes de lithographie souple. A/ Création du tampon. B/ Etapes de microcontact printing

pouvoir assurer une définition suffisante de la géométrie du micropattern. Ces deux propriétés contradictoires limitent non seulement la résolution de cette technique mais également les géométries possibles. La résolution peut atteindre $1\mu\text{m}$ pour certaines géométries. Le micropatterning possède néanmoins d'autres inconvénients. Il est par exemple difficile de créer des surfaces homogènes de plus de 2 cm^2 . L'efficacité du transfert est également inférieure à 100% et montre de grandes variations d'une expérience à l'autre. De plus, durant le procédé, une fraction non contrôlée de molécules peuvent subir une altération de leur propriété biologique. Par contre, ce type de technologie possède le grand avantage de pouvoir réaliser des surfaces composées de plusieurs molécules différentes patternées.

La photolithographie

La photolithographie a été originellement développée pour la micro-électronique. Ce procédé consiste à transférer sur un substrat les dessins géométriques dessinés sur un masque par illumination UV. Les masques sont généralement en quartz sur lesquels une fine couche de chrome est déposée, présentant la géométrie désirée. Ces masques possèdent donc des zones transparentes (quartz) et opaques (chrome). De tels masques en quartz possèdent une résolution de $1\mu\text{m}$. Si une telle résolution n'est pas nécessaire, des masques en plastique moins coûteux peuvent être réalisés.

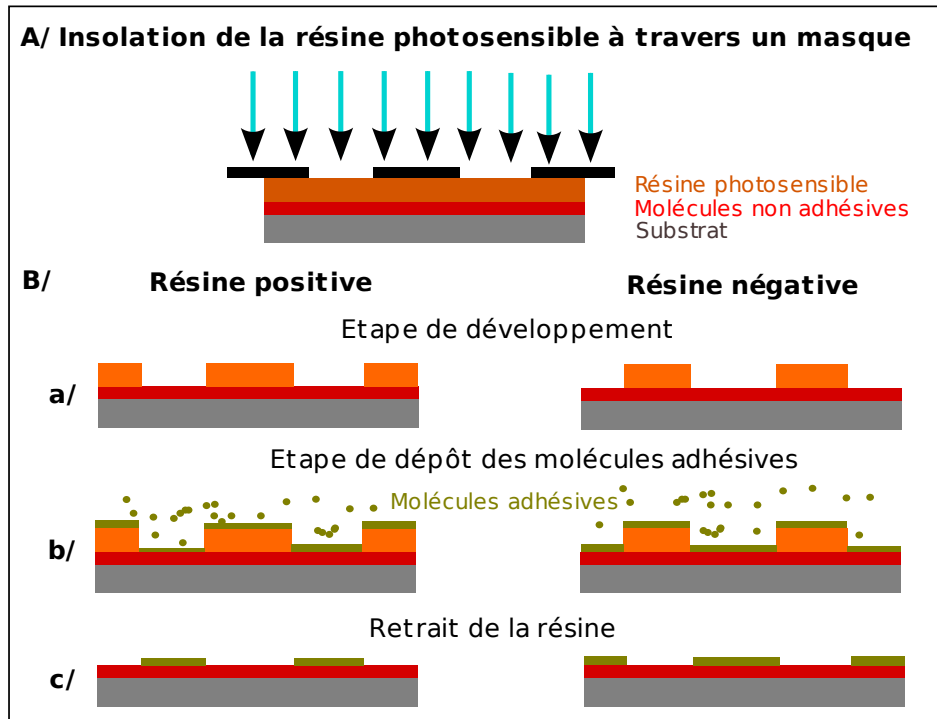


FIGURE 2.3: Représentation schématique des étapes de la photolithographie pour la création de substrats à contraste d'adhésion.

Les étapes de la photolithographie sont exposées figure 2.3. Une couche d'épaisseur homogène de résine photosensible est étalée sur le substrat grâce à une tournette permettant de faire tourner l'échantillon à la vitesse désirée lors de l'étalement (la vitesse de la tournette déterminera l'épaisseur de la couche de résine, selon sa viscosité). Après une étape de recuit, le masque est placé au contact du substrat et de sa couche de résine dans un aligneur UV. Ce dernier est équipé d'une source de lumière UV qui peut être activée pendant un temps désiré. Seules les zones non cachées par le chrome du masque sont insolées (Fig 2.3/A). Une étape de développement, consistant à appliquer un solvant spécial, va permettre d'enlever soit les parties insolées (si la résine est positive), soit les parties non insolées (si la résine est négative) (Fig 2.3/B-a). Le substrat possède maintenant deux types de surface : des endroits où reste de la résine, et des zones où le substrat est à nu. En déposant des molécules en phase liquide, celles-ci vont s'adsorber sur les deux surfaces (Fig 2.3/B-b). En rinçant avec un solvant, les restes de résine vont partir (Fig 2.3/B-c). Ainsi, il restera des zones où le substrat est à nu et des zones recouvertes des molécules désirées. Si le substrat a été préalablement traité pour être non adhésif et que les molécules sont des promoteurs

d'adhésion des cellules, alors les cellules ne pourront adhérer qu'aux endroits où sont déposées ces molécules. La technique de photolithographie a pour grand intérêt de pouvoir être utilisée avec n'importe quel type de géométrie avec une résolution de $1\mu\text{m}$. Il est par contre plus difficile que pour le microcontact printing de créer des substrats à plusieurs protéines micropatternées. Cette technique n'est pas très répandue dans les laboratoires de biologie car, pour pouvoir la mettre en oeuvre, une salle blanche équipée d'un aligneur UV et d'une tournette est nécessaire.

2.1.3 Applications

A l'origine, les substrats micropatternés ont été introduits en biologie par George Whitesides et Donald Ingber (Harvard University) dans le but de contrôler la forme et la taille des cellules. Ces premières études ont mis en avant le rôle primordial de la forme de l'étalement des cellules dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la régulation de leur cycle, leur survie et leur mort. Depuis, de nombreuses applications ont vu le jour, avec des substrats micropatternés variant selon les applications souhaitées. Des études sur l'influence de la géométrie des micropatterns sur la migration des cellules ont par exemple été réalisées. Il a en effet été prouvé que certaines géométries asymétriques peuvent orienter la migration des cellules selon leur type cellulaire (Mahmud G, 2009). Le comportement mécanique de structures multicellulaires sur des micropatterns a pu également être étudié (Nelson CM, 2005), révélant des zones de plus grand stress selon la géométrie du pattern (Fig. 2.4/D). De même, une influence de ces forces mécaniques sur la différenciation de cellules souches en types cellulaires particuliers a ainsi été prouvée (Fig. 2.4/E) (Ruiz SA, 2008).

Ces études sont réalisables en couplant les techniques de micropattern avec des méthodes de mesures de forces. Il est par exemple possible de cultiver les cellules sur des micropiliers (Tan JL, 2003). La déformation de chaque micropilier induite par les mouvements de cellules indiquera la force exercée par la cellule sur celui-ci (Fig. 2.4/A, B et C). Une autre méthode consiste à créer des micropatterns sur des gels de polyacrylamide remplis de microbilles fluorescentes. En filmant le mouvement de celles-ci, il sera alors possible de remonter aux forces développées par la cellule pour déformer le gel (Wang N, 2002a).

Ainsi, de nombreuses applications des micropatterns peuvent être envisagées. Nous détaillerons ici plus précisément celles réalisées sur cellules uniques et notamment concernant l'influence des différentes géométries sur le contrôle de la forme des cellules, leur fonction et leur organisation interne. Ingber et Whitesides ont montré qu'il était possible de contrôler la forme de la cellule avec des patterns de matrice extracellulaire (Chen CS, 1998). Ainsi, une cellule adhérent sur un pattern

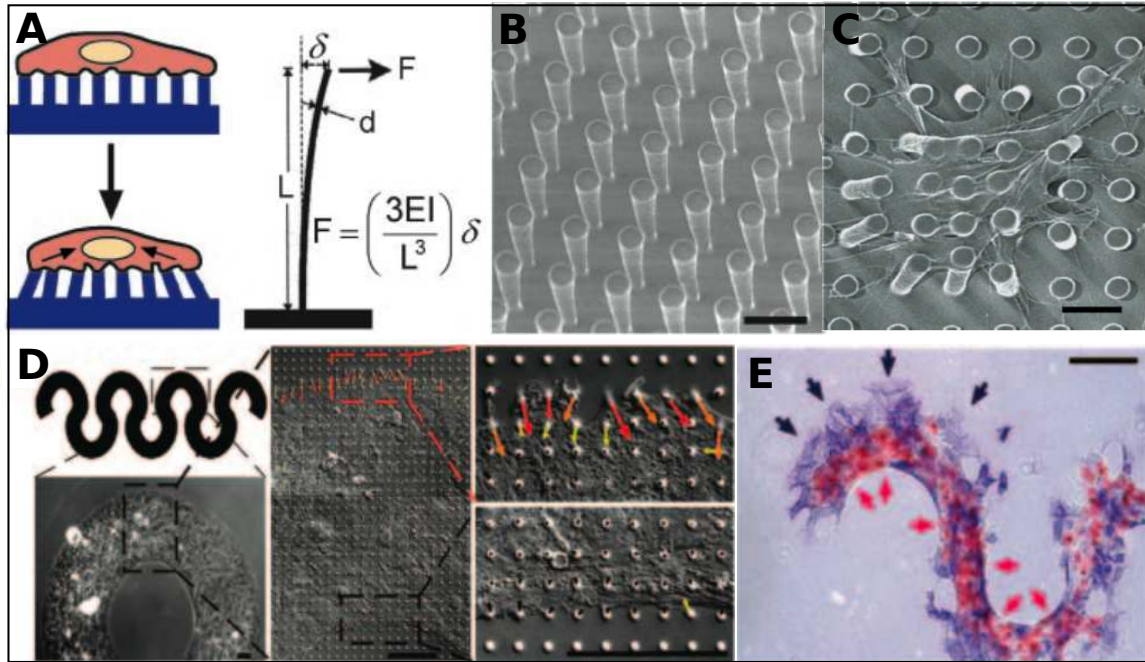


FIGURE 2.4: Mesures de forces développées par les cellules sur des micropatterns à l'aide de micropilliers (A, B et C) (Tan JL, 2003). A/ Schéma du concept de mesure des forces par la déformation de micropilliers de PDMS. B/ Image en microscopie électronique des micropilliers. C/ Cellule musculaire cultivée sur micropilliers en microscopie électronique. Les forces exercées par celle-ci pour se développer déforment les micropilliers (les barres d'échelle indiquent $10\mu\text{m}$). **Influence des forces mécaniques sur la différenciation des cellules souches mesurées à l'aide de micropilliers (D et E) (Ruiz SA, 2008).** D/ A gauche : géométrie du pattern utilisé en forme de vagues avec une culture de cellules souches sur celui-ci au dessous. Au milieu : Représentation des mouvements des micropilliers. Les forces de tension sont plus importantes sur l'extérieur de la vague. A droite : culture de cellule souche sur le pattern en forme de vagues. En rouge : marquage d'adipogénèse, en bleu : marquage d'ostéogénèse. L'ostéogénèse apparaît sur l'extérieur de la vague, à l'endroit où les forces de tension sont les plus importantes. Barre d'échelle : $250\mu\text{m}$

carré adopte la même morphologie (Fig. 2.5/A). Ces mêmes études ont montré que le degré de synthèse de l'ADN ainsi que l'apoptose et le cycle cellulaire peuvent être modulés en ensemençant les cellules sur des îlots de plus en plus petits (Fig. 2.5/C). Les forces développées par la cellule peuvent être également localisées à des endroits précis de la géométrie du pattern. Ainsi, pour une cellule carrée, les forces les plus importantes seront développées aux quatre angles de celui-ci (Wang N, 2002b)(Fig. 2.5/D et E). Les lamellipodes émergent alors aux endroits où le plus de contraintes sont exercées, c'est à dire dans le cas du carré, aux angles (Parker KK, 2002).

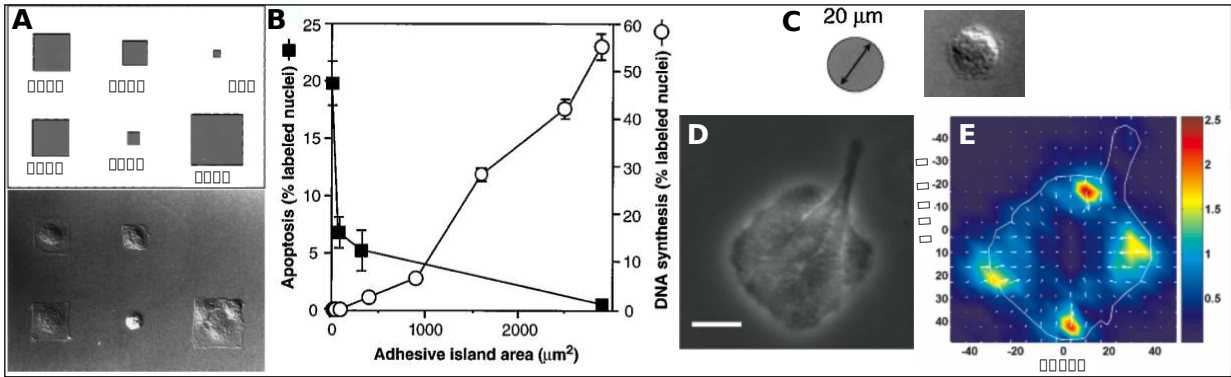


FIGURE 2.5: **Etude du comportement de cellules uniques selon la géométrie de l'îlot adhésif (A, B et C) (Chen CS, 1997).** A/ Cellules sur patterns carrés de différentes tailles. En haut les géométries des patterns. En bas, les cellules épithéliales en contraste de phase. B/ Pourcentage de cellules mortes et de synthèse d'ADN en fonction de l'aire de la cellule, 24 heures après l'ensemencement. C/ Exemple de cellule épithéliale cultivée sur un pattern en forme de cercle (Chen CS, 1997). **Etude des forces développées par une cellule musculaire adhérent sur un plot carré de $50\mu\text{m}$ de côté (D et E) (Wang N, 2002a).** D/ Cellule en contraste de phase. La barre d'échelle représente $20\mu\text{m}$. E/ Carte des déplacements des billes fluorescentes dans le gel de PDMS induits par les forces développées par la cellule.

Dans ces travaux les cellules adhéraient sur des îlots de molécules adhésives de différentes formes et tailles. Cependant, pour une même forme de cellule induite, l'adhésion peut être différente (Fig.2.6/A). En effet, il est possible de créer des patterns sur lesquels la cellule n'adhère pas sur toute sa surface. Ces études ont été réalisées en ensemençant des cellules Hela[†] sur des micro-patterns de fibronectine[‡] de différentes formes tels que des rectangles, cercles, triangles ou 'L' par exemple (Théry M, 2005) (Théry M, 2006a) (Théry M, 2006b). Ces changements d'adhésion de la cellule induisent une modification de son organisation interne. L'organisation du cytosquelette avec son réseau d'actine, ses fibres de stress, ses microtubules est en effet gouvernée par la géométrie du pattern de façon reproductible (Fig.2.6/A et B) (Théry M, 2006a). L'axe de division de la cellule peut également être guidé par la forme de celle-ci et ses contacts avec la matrice extracellulaire (Théry M, 2005). L'axe du fuseau mitotique, orienté aléatoirement sur des patterns circulaires, prend une position particulière sur des patterns en forme rectangle (suivant le grand axe) et en forme de triangle ou 'L' (parallèle à l'hypoténuse). L'organisation du cytosquelette gouvernée par la géométrie du pattern d'adhésion induit également un contrôle de la position des organites cellulaires. Celle du centrosome, noyau ou appareil de Golgi par exemple peut être contrôlée de

[†]. lignée cellulaire cancéreuse

[‡]. composant essentiel de la matrice extracellulaire interagissant avec les intégrines, protéines d'adhésion des cellules

façon reproductible (Fig.2.7) (Théry M, 2006b)) .

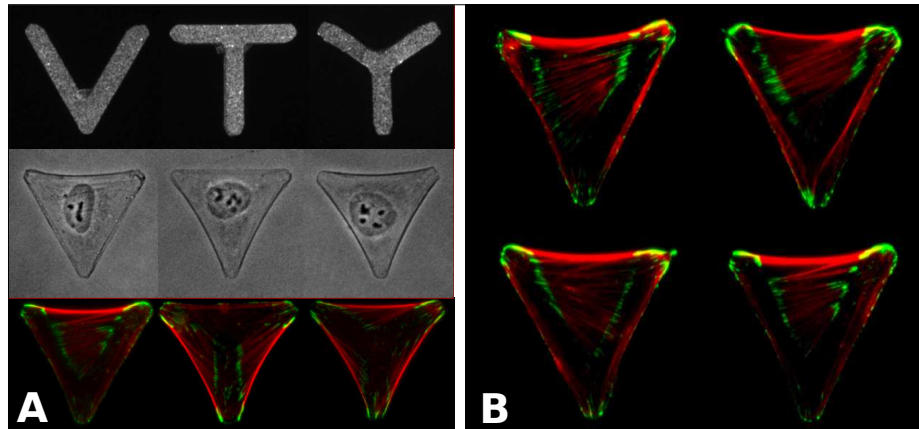


FIGURE 2.6: Modification de l'organisation du cytosquelette d'une cellule Hela en utilisant des patterns gardant la même forme cellulaire globale mais modifiant la géométrie possible d'adhésion(Théry M, 2006a). A/ Première ligne : Pattern de fibronectine. Deuxième ligne : Cellule Hela en contraste de phase cultivée sur chaque type de pattern. Troisième ligne : Organisation du cytosquelette sur chaque pattern. En rouge : les fibres d'actine. En vert : la vinculline marquant les sites où la cellule adhère. B/ Quatre cellules cultivées sur le même pattern. Leur architecture est reproductible

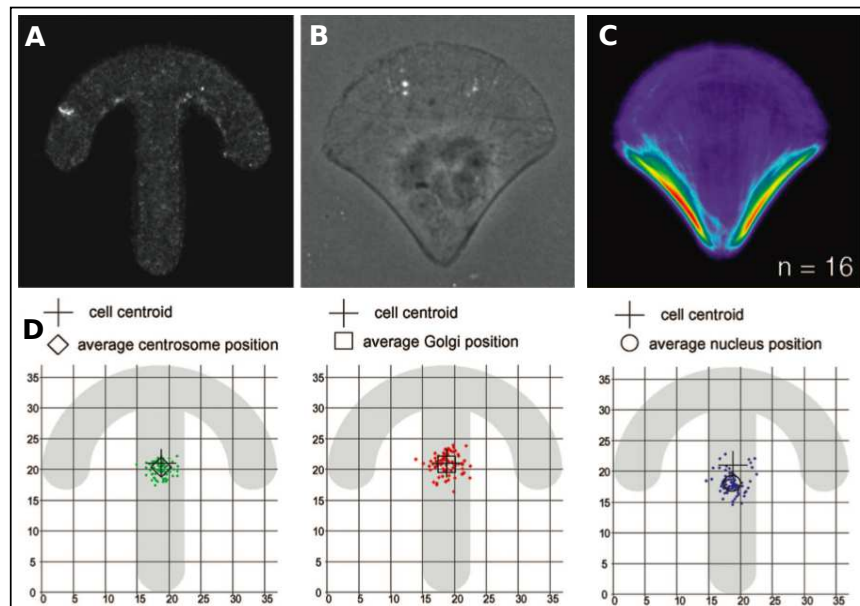


FIGURE 2.7: Contrôle de l'organisation interne d'une cellule par la géométrie des zones adhésives en forme d'ancre (Théry M, 2006b). A/ Pattern de Fibronectine. B/ Cellule Hela cultivée sur le pattern en contraste de phase. C/ Position des fibres de stress sur 16 cellules. D/ Distribution spatiale des positions des organites cellulaires : centrosome, noyau et appareil de Golgi sur 75 cellules. Ceux-ci se retrouvent de façon reproductible à une position précise du pattern.

Ainsi, les différentes géométries de pattern utilisées peuvent gouverner l'organisation interne des cellules. Ils peuvent modifier de façon très reproductible la répartition des forces à l'intérieur de la cellule mais aussi la position des organites cellulaires.

2.2 Des neurones sur patterns

L'utilisation de patterns dans le domaine des neurosciences a connu un essor ces dernières années dans le but de créer des réseaux de neurones *in vitro* ayant une architecture contrôlée. Le besoin de tels réseaux provient de la nécessité de simplifier les réseaux de neurones *in vitro*. En effet, lorsque l'on cultive des neurones sur un substrat homogène, ceux-ci vont créer des connexions multiples et aléatoires (Fig.2.8/A) . L'étude de tels réseaux et l'interprétation des résultats est alors très difficile puisqu'il est quasiment impossible de déterminer les multiples connexions établies par chaque neurone.

Nous aborderons dans une première partie les techniques utilisées pour créer des réseaux de neurones à architecture contrôlée et l'intérêt de leur utilisation. Dans une seconde partie, le contrôle de la position de l'axone dans ces mini-réseaux sera étudiée.

2.2.1 Des réseaux de neurones à architecture contrôlée

En utilisant des géométries en forme de plot pour les corps cellulaires et de ligne pour le développement des neurites, il est possible de contrôler la position des corps cellulaires et les connexions établies (Fig.2.8/B,C) (Wyar C, 2002).

L'utilisation de patterns permet d'une part de recréer une architecture organisée au sein des cultures *in vitro* et d'autre part, cela permet de placer les corps cellulaires au dessus de capteurs extracellulaires permettant d'enregistrer l'activité électrique des neurones tels que les matrices d'électrodes (Fig2.9/A et B) (Jun SB, 2007) ou les transistors (Fig2.9/C..G) (Merz M, 2005). Ainsi, il semble possible, en utilisant ce genre de technologie, de disposer de réseaux de neurones dont l'activité peut être enregistrée en temps réel. Reste alors à optimiser au mieux la position des corps cellulaires, la détection des signaux ainsi que la survie de ces réseaux. De nombreuses études ont été réalisées afin de trouver les géométries adéquates dans le but à la fois améliorer la survie des réseaux de neurones sur micropattern mais aussi d'améliorer le placement des corps cellulaires aux endroits désirés sans agrégats. En effet, l'objectif technique recherché consiste souvent à disposer d'un réseau de neurones pour lequel chaque neurone peut être enregistré et stimulé de manière

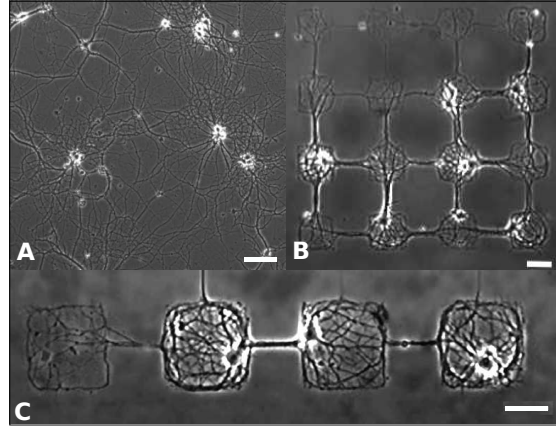


FIGURE 2.8: **Réseau de neurones en culture *in vitro*** A/ Culture *in vitro* aléatoire de neurones d'hippocampes de souris à 22 jours de culture. Les connexions formées sont aléatoires et multiples. La barre d'échelle représente $120\mu\text{m}$. B/ Culture *in vitro* de neurones d'hippocampe de rat à architecture contrôlée. Les corps cellulaires se situent sur les plots carrés de $80\mu\text{m}$ de côté et les prolongements suivent les lignes d'épaisseur variant entre 2 et $4\mu\text{m}$ d'après une géométrie rectangulaire. La barre d'échelle représente $50\mu\text{m}$. C/ Zoom d'une ligne du réseau de la photo B/. La barre d'échelle représente $50\mu\text{m}$ (Wyar C, 2002).

indépendante, pendant une durée la plus longue possible. La taille du plot et l'épaisseur des lignes, ont été étudiées (Wyar C, 2002) (Lauer L, 2001) (Scholl M, 2000). Ceux-ci varient selon le type de neurone utilisé[§]. Typiquement, plus on augmente le diamètre du plot pour le corps cellulaire, moins le neurone est contraint, mais plusieurs neurones peuvent alors y adhérer. Les lignes aussi ne doivent pas être trop épaisses pour que les corps cellulaires ne puissent pas adhérer. Différents traitements de surface ont également été testés afin de trouver le substrat le plus adapté pour permettre à la fois la survie des neurones mais aussi du pattern[¶] (Nam Y, 2006) (Zhang Z, 2005). Les cellules gliales peuvent en effet synthétiser des protéines de matrice extracellulaire qui envahissent les zones non permissives, les rendant par la même occasion adhésives, d'où une perte du contraste d'adhésion. La densité de cellulesensemencées a également été étudiée dans le but de garder la géométrie du pattern. En effet, plus la densité est importante, plus les 'câbles' formés sur les neurites peuvent déformer le réseau. Une équipe a même mis au point des 'neurocages' afin de pouvoir piéger chaque corps cellulaire près d'une électrode (Erickson J, 2008). Ces neurocages sont des structures tri-dimensionnelles en parylène disposant d'une zone centrale pour l'emplacement d'un corps cellulaire au dessus d'une électrode, et de tunnels pour que les neurites puissent se développer et se connecter à d'autres neurones (Fig. 2.10).

[§]. la taille des corps cellulaires peut varier selon le neurone utilisé : de $10\mu\text{m}$ de diamètre pour un neurone d'hippocampe de souris par exemple à $40\mu\text{m}$ de diamètre pour un neurone d'escargot.

[¶]. Ces techniques sont multiples selon le substrat utilisé, la molécule d'adhésion choisie..

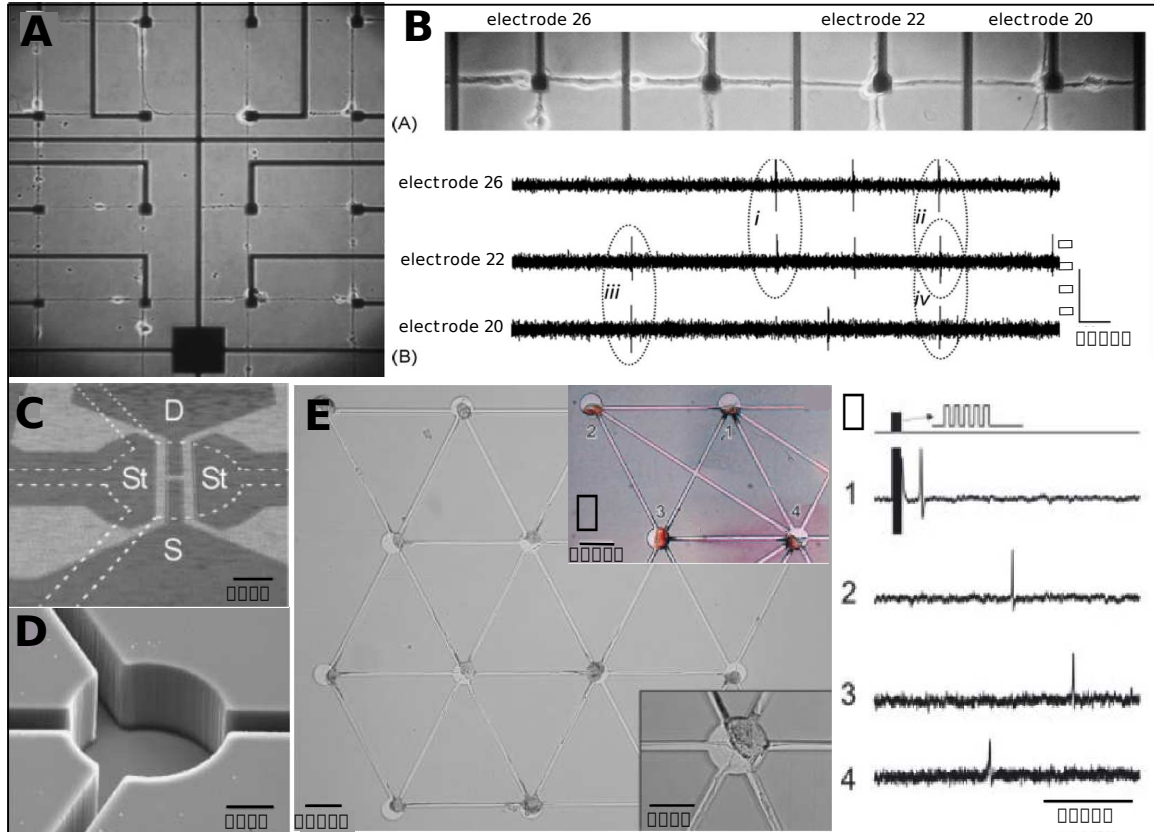


FIGURE 2.9: Des micropatterns pour le placement de neurones sur des appareils de mesure extracellulaire : Matrices d'électrodes (A et B) et Microtransistors (C à G). Culture de neurones micropatternnés sur des micro-électrodes (A et B). A/ Neurones d'hippocampe de rat 2 semaines après l'ensemencement sur des micro-électrodes avec une architecture contrôlée. Photo en contraste de phase. B/ Exemple d'enregistrements montrant la propagation du signal dans une chaîne de neurones à 20 jours de culture. Photographie en contraste de phase des trois emplacements cellulaires enregistrés avec leurs enregistrements correspondants (Jun SB, 2007). **Microtransistors pour la mesure de l'activité électrique de neurones d'escargots.** C/ Image en microscopie optique du transistor : la source (S) et le drain (D) sont indiqués. La petite zone claire ($3\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$) entre le drain et la source est la grille ouverte (le neurone fera office de grille) d'un transistor à effet de champs. 'St' représente les deux armatures d'une capacité qui permettra de stimuler le neurone. En pointillé est indiqué le positionnement de la structure de guidage des neurones., D/ Image de microscopie électronique de la structure de guidage des neurones en polyester : trou central pour le positionnement du soma et lignes pour le développement des neurites. E/ Réseau de neurones d'escargots à architecture contrôlée (zoom en bas à droite). F et G/ Réponse d'un réseau de quatre neurones (F) à une stimulation électrique sur le neurone 1. Les enregistrements sont affichés dans la figure G. (Merz M, 2005)

Ainsi, de nombreuses techniques se sont développées pour contrôler la position des corps cellulaires et le développement des neurites le plus durablement possible. Cependant, une des questions fondamentales est de savoir si les nombreuses contraintes appliquées sur les neurones les empêchent

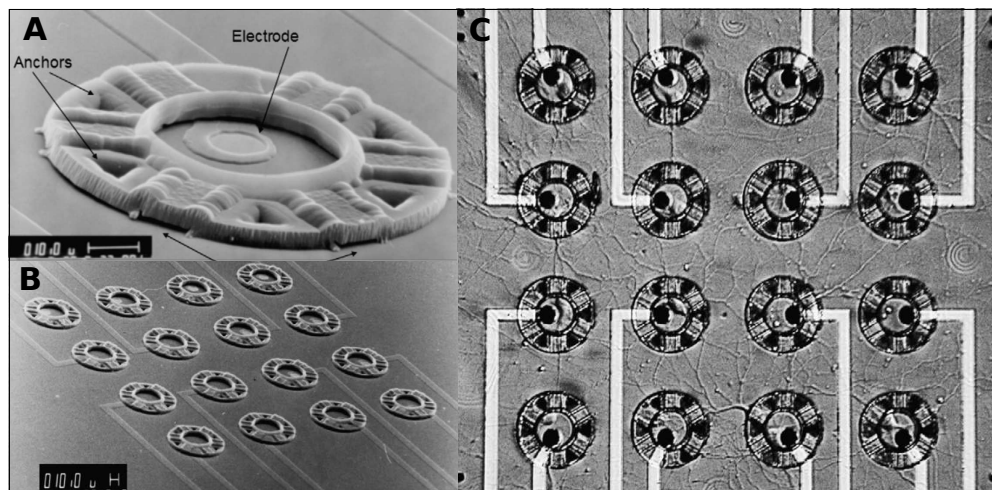


FIGURE 2.10: Des neurocages pour le contrôle de la position des corps cellulaires au-dessus d'électrodes de mesure A/ Détail d'une neurocage en photographie SEM. La barre d'échelle mesure $10\mu\text{m}$. B/ Réseau de neurocages. La barre d'échelle mesure $10\mu\text{m}$. C/ Réseau de neurones d'hippocampe de rat à 10 jours de culture cultivé sur les neurocages. Certains corps cellulaires sont piégés dans des neurocages. Les neurites sont passées à travers les tunnels. (Erickson J, 2008).

de créer des réseaux fonctionnels. Dans ce but, une équipe a vérifié la fonctionnalité des réseaux de neurones sur micropatterns par patch clamp (Vogt AK, 2003). Ils ont ainsi montré, en étudiant leur comportement électrique, que les neurones adhèrent, se différencient et forment des synapses matures et fonctionnelles même s'ils sont cultivés à faible densité sur micropatterns. Cette même équipe a démontré qu'ils possèdent également, comme les réseaux de neurones *in vivo* une plasticité synaptique (Vogt AK, 2005).

Les réseaux de neurones à architecture contrôlée sont donc de formidables outils dont la fonctionnalité a été prouvée. Il est alors possible de disposer de réseaux dont les neurones peuvent être enregistrés, permettant l'étude de leur comportement en fonction de leur architecture et leur évolution en fonction de leurs expériences. Cependant, de nombreuses améliorations techniques restent encore à réaliser pour disposer d'un réseau dans lequel chaque neurone pourrait être stimulé et/ou enregistré.

2.2.2 Contrôler la polarisation axonale avec des micropatterns

Une étape supplémentaire pour créer des réseaux de neurones modèles est le contrôle du sens de l'information, c'est à dire de la position de l'axone. Ce contrôle est primordial pour pouvoir réaliser des études sur le comportement des réseaux de neurones en fonction de leur architecture. Une même architecture de réseau, avec la même connectivité doit être reproductible pour se prêter à une étude statistique. Sans le contrôle de la position de l'axone, le nombre de réseaux à étudier avant de trouver plusieurs fois la même connectivité serait beaucoup trop important. C'est pourquoi contrôler la position de l'axone est si crucial. Des micropatterns ont été utilisés dans ce but. Seul une équipe a réussi à contrôler la polarisation de l'axone à 78% mais ce résultat a été controversé. Nous détaillerons dans ce paragraphe les idées mises en oeuvre pour essayer de contrôler la position de l'axone.

L'une des idées récurrentes dans la création du design de ces patterns est de modifier localement l'adhésion des neurites. Ainsi, comme énoncé dans le chapitre 1, Lemmon et al. ont montré qu'en créant des bandes d'adhésion différentes, le premier neurite qui rencontre la frontière se différencie en axone (Fig2.11)(Esch T, 1999). Oliva et al. ont également utilisé des patterns à deux molécules

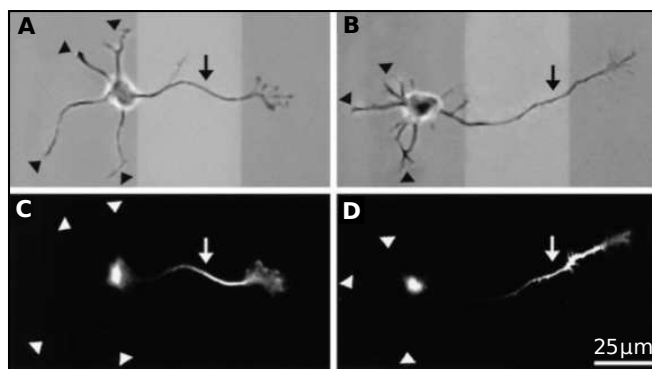


FIGURE 2.11: **Contrôle de la polarisation axonale par une modification locale d'adhésion (Esch T, 1999).** A/ et B/ Neurones d'hippocampe de rat 24h après l'ensemencement cultivés sur des bandes de polylysine et laminin (laminin en clair). C/ et D/ Marquage de ces neurones avec un marqueur axonal Tau-1. Le marqueur est concentré dans l'axone en développement (flèche) et absent des neurites.

d'adhésion : poly-L-lysine et Fc-L1^{||} afin de contrôler la position de l'axone (Oliva AA, 2003). Ceux-ci suivent alors les chemins de Fc-L1 alors que les futures dendrites poussent sur la poly-L-

^{||}. Protéine chimérique : liaison entre le domaine extracellulaire de la protéine de guidance L1 et du fragment Fc d'IgG. La molécule d'adhésion L1 est une protéine transmembranaire exprimée sélectivement à la surface de l'axone. Elle se lie aux protéines L1 exprimée sur la surface des autres axones. L1 promouvoit donc la pousse axonale et la fasciculation des axones. Le fragment Fc d'IgG permettra de reconnaître la protéine micro-patternée sur le substrat.

lysine (Fig 2.12). Cependant, pour le moment, les technologies consistant à utiliser deux molécules d'adhésion n'ont pas été utilisées pour créer des réseaux contrôlés et déterminer l'efficacité de l'orientation. Une autre publication utilise quant à elle la géométrie du pattern pour moduler

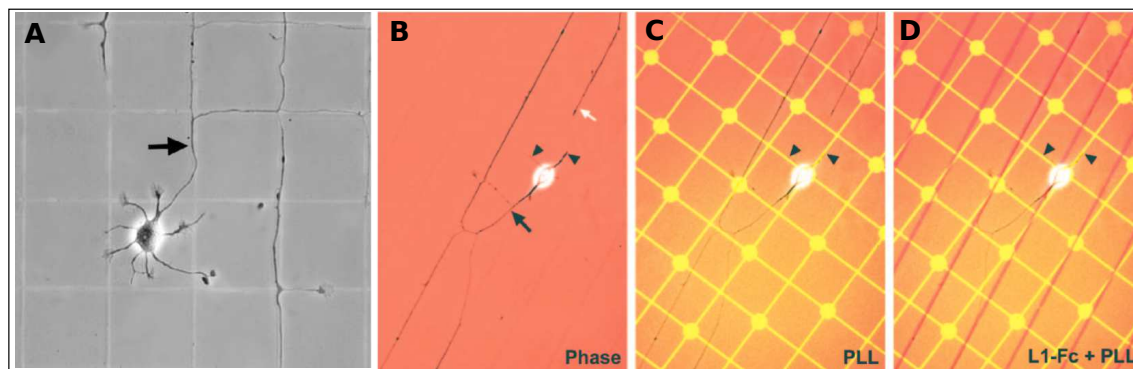


FIGURE 2.12: **L1-Fc guide sélectivement les axones (Oliva AA, 2003).** A/ Neurone d'hippocampe de rat à 2 jours de cultures sur un micropattern de poly-L-lysine (gris foncé) et Fc-L1 (gris clair). L'axone suit sélectivement les lignes de Fc-L1 (flèche). Les carrés de polylysine mesurent $50 \times 50 \mu\text{m}$ et l'épaisseur des lignes $2 \mu\text{m}$. **Neurone d'hippocampe de rat 20h après ensemencement sur un pattern de poly-L-lysine et Fc-L1 (B, C et D).** B/ Image en contraste de phase. L'axone est indiqué par une flèche. C/ Superposition de l'image en contraste de phase et de la poly-L-lysine-FITC en jaune. D/ Superposition de l'image en contraste de phase avec le pattern de poly-L-lysine-FITC et celui de L1-Fc (en rouge). L'axone pousse préférentiellement sur les lignes de L1-Fc lors que les futures dendrites suivent le pattern de poly-L-lysine. Les carrés de polylysine mesurent $50 \mu\text{m}$ de côté et l'épaisseur des lignes $2 \mu\text{m}$

l'adhésion sur un des chemins possibles pour le développement des neurites (Stenger DA, 1998). Ainsi, le pattern est constitué d'un plot de $25 \mu\text{m}$ de diamètre pour le corps cellulaire duquel émerge quatre chemins pour le développement des neurites, dont trois sont en pointillés et un en ligne pleine** (Fig2.13/A). Les auteurs émettent l'hypothèse que si l'un des chemins est plus adhésif (celui en ligne pleine), l'axone devrait se développer sur celui-ci. Leurs résultats indiquent que $76\% \pm 11\%$ (176 cellules comptées) des neurones développent un prolongement de longueur supérieure à $100 \mu\text{m}$ dans le sens attendu. Ce plus long prolongement a été marqué avec des protéines spécifiques de l'axone afin de confirmer son identité (Fig2.13/B).

Cependant, ce résultat a été contesté par une publication plus récente (Vogt AK, 2004). Les auteurs ont utilisé la même géométrie composée de trois lignes en pointillés et une ligne pleine pour créer cette fois-ci des réseaux de neurones orientés (Fig2.14/A). Afin de déterminer la position de l'axone, ils ont choisi d'utiliser une détermination fonctionnelle en effectuant du patch clamp^{††} sur

**. La taille des gaps varie de 5 à $20 \mu\text{m}$ selon le pattern. Cependant, aucune différence dans les statistiques de la position du plus long prolongement des différents patterns n'a été remarquée.

††. Méthode de mesure intracellulaire de l'activité électrique des neurones. Technique électrophysiologique d'en-

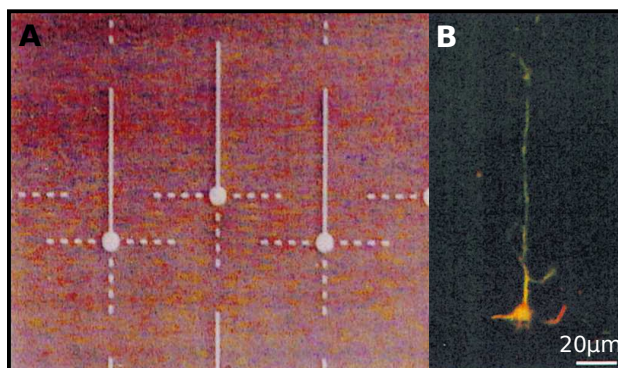


FIGURE 2.13: **Contrôle de la polarisation axonale par des patterns (Stenger DA, 1998).** A/ Photographie en microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC) de la monocouche adhésive du pattern, préalablement marquée avec un catalyseur Pd-Cl et métallisée avec du nickel. B/ Neurone d'hippocampe de rat cultivé sur un pattern A/ après 4 jours de culture, présentant son axone dans le sens désiré. Le neurone a été marqué avec les anticorps contre NF150 (en vert) et MAP 2 (en rouge)

des cellules entre 2 et 3 semaines de culture. En stimulant une des cellules, ils ont regardé la réponse des cellules voisines (Fig2.14/B). Une fois trouvé un contact synaptique entre deux cellules^{‡‡}, ils ont déterminé l'orientation du prolongement et l'ont comptabilisé comme bien orienté si positionné sur la ligne pleine et mal orienté dans le cas contraire (Fig2.14/C). Bien qu'une légère orientation de l'axone sur la ligne pleine semble apparaître (35% d'axones orientés sur la ligne pleine sur 49 cellules testées), ce résultat n'est pas significatif (+/- 17%). Les auteurs ont par la suite vérifié avec succès le fait que la ligne pleine était plus adhésive en appliquant un stress mécanique sur les neurones puis en marquant les neurofilaments. L'une des principales hypothèses prédisant que l'axone pousserait sur une ligne plus adhésive consistait à penser que la vitesse de pousse serait alors plus rapide*. C'est pourquoi ils concluent que même si les neurites rencontrent des chemins avec différentes adhésivités, cela ne mène pas forcément à une plus rapide elongation suivant le chemin le plus adhésif, et donc à la formation d'un axone.

D'autres pistes pour le contrôle de la position de l'axone, encore à leurs prémices, sont en train d'être développées. Celles-ci se basent sur l'importance de l'environnement mécanique sur la pousse de l'axone. En effet, *in vivo*, l'axone est capable de choisir sa direction en se frayant un chemin vers sa cible. Il paraît alors important que celui-ci puisse ressentir les contraintes topologiques

registrement des courants ioniques transitant à travers les membranes cellulaires qui consiste à mettre en contact ou à pénétrer la cellule avec une micropipette en verre (diamètre de contact de l'ordre de 1μm) remplie d'une solution ionique de composition définie.

‡‡. un potentiel d'action déclenché par stimulation d'une cellule en déclenche un dans la cellule voisine

*. Lors de la différenciation axonale, un des neurites va pousser plus rapidement que les autres, devenant ainsi l'axone

environnantes. Des études sont donc réalisées en utilisant des topographies en trois dimensions. Bien que le contrôle de la position de l'axone n'ait pas encore été réalisé, des résultats montrent que celui-ci, en fonction de la topographie du substrat, est capable de choisir sa direction (Li N, 2005).

Ainsi, la plupart des pistes pour contrôler la position de l'axone avec des micropatterns se basent sur des modifications locales d'adhésion ou sur des contraintes mécaniques imposées par des substrats en trois dimensions. Cependant, pour le moment, un contrôle efficace de la différenciation axonale permettant de créer des réseaux modèles n'a pas encore été réalisé.

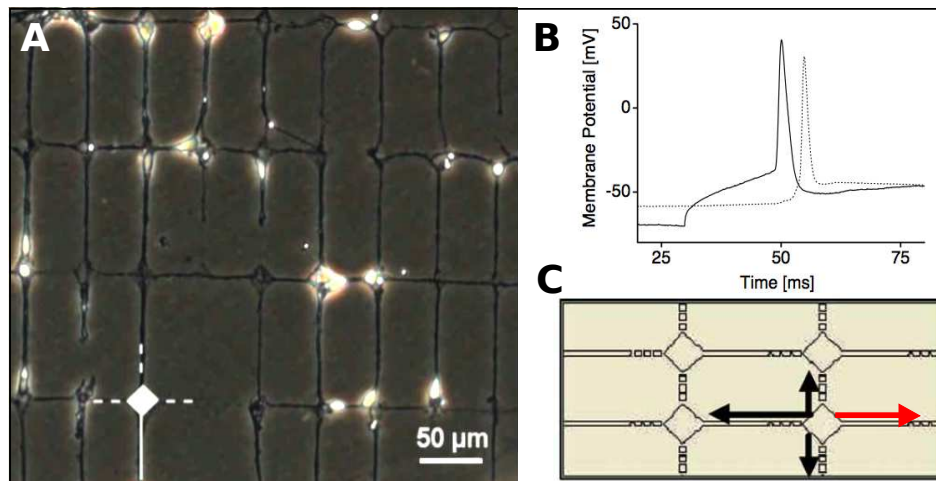


FIGURE 2.14: Vérification de l'orientation d'un réseau de neurone avec un pattern censé orienter à 76% (Vogt AK, 2004). A/ Réseau micropatterné de neurones corticaux de rat à 12 jours de culture. La géométrie du pattern est indiqué en blanc. B/ Mesure simultanée en patch clamp de deux neurones pour la détection de synapses. Exemple de connexion synaptique entre deux neurones. Un premier neurone est stimulé (réponse en ligne pleine). La réponse du second est enregistrée (réponse en ligne pointillée). C/ Schéma de la géométrie du pattern du réseau. La flèche rouge indique une position correcte de l'axone, les flèches noires une position incorrecte.

Deuxième partie

Vers un contrôle de la différenciation axonale

A mon arrivée en thèse, mon projet consistait à créer des réseaux de neurones modèles cultivés sur des matrices d'électrodes afin d'explorer quelques mécanismes fondamentaux de la communication en réseaux. Ce projet était réalisé en collaboration avec une équipe de traitement du signal du GIPSA lab, Grenoble. L'une des études envisagées consistait notamment à étudier l'influence du bruit neuronal* sur la transmission de l'information. Dans les premiers mois de ma thèse, des réseaux de neurones à architecture contrôlée ont été cultivés sur matrices d'électrodes. L'étape suivante consistait alors à réaliser des mini-réseaux de même connectivité afin de posséder une statistique suffisante pour pouvoir étudier correctement le comportement d'une architecture donnée. Par un rapide calcul de probabilité, nous nous sommes rapidement rendus compte que la chance d'obtenir exactement la même connectivité pour un mini-réseau de trois neurones était beaucoup trop faible†. Il est donc devenu crucial de contrôler la position de l'axone avec une bonne probabilité dans nos mini réseaux.

Une recherche bibliographique a mis en évidence les méthodes envisageables pour guider l'axone *in vitro*. Pour la plupart, celles-ci n'étaient pas adaptables à notre configuration qui consistait à réaliser une centaine de mini réseaux dans lesquels chaque axone serait guidé. En effet, l'idée la plus évidente consistait à placer des molécules attractives de l'axone à des emplacements précis (cf. 1.3.3 page 41). Cependant, bien que l'efficacité de ces molécules soit prouvée, cette méthode pouvait difficilement être mise en oeuvre. Il aurait fallu encapsuler les molécules et venir les libérer à plus d'une centaine d'emplacements, après l'ensemencement des neurones. Outre le temps nécessaire pour libérer toutes les cages, des problèmes de diffusion des molécules dans le milieu auraient certainement gêné la localisation précise des axones. De plus, comment réaliser par exemple un mini réseau de trois neurones connectés en boucle avec ce type de méthodes ? Où placer les molécules pour n'affecter qu'un seul neurone ? D'autres méthodes connues, plus ou moins efficaces, telles que les champs électriques, magnétiques ou lumineux, n'étaient pas non plus idéales pour notre utilisation (cf. 1.3.3 page 42). Il aurait fallu, dans le cas du laser, venir guider un par un les centaines de neurones présents dans la culture. Seule l'utilisation de champs électriques locaux créés par les matrices d'électrodes elles-mêmes auraient été envisageable mais toutes les architectures n'auraient alors pas été possibles. Prenons toujours le cas d'un mini réseau de trois neurones connectés en

*. On désigne par bruit neuronal l'activité spontanée présente systématiquement dans les réseaux neuronaux (*in vivo* ou *in vitro*). Ce 'bruit neuronal' est considéré comme fondamentalement positif pour le traitement de l'information par le système nerveux

†. 3,7% de chance d'avoir un mini réseau orienté correctement pour un réseau de trois neurones avec trois chemins de développement pour les neurites. Cette statistique descend encore notablement si l'on prend en compte le fait que tous les mini-réseaux n'auront pas forcément leur trois emplacements avec un unique neurone et que les neurones puissent être de types différents.

boucle. Si l'on impose les trois potentiels simultanément, il n'est pas possible de réaliser une boucle. Si l'on crée des différences de potentiels entre deux électrodes les unes après les autres, cela devient alors possible, mais entre temps les autres neurones peuvent s'être différenciés. Finalement, aucune de ces méthodes n'a retenu notre attention. Nous nous sommes donc rapidement intéressés aux micropatterns pour arriver à guider l'axone. Si un motif spécial du substrat permettait de guider l'axone, cela permettrait de réaliser facilement de nombreux réseaux simultanément, sans avoir ensuite à agir une fois les neurones déposés, ce qui de plus limiterait le stress induit sur les neurones en culture. Deux méthodes semblaient alors être envisageables :

- La réalisation de réseaux à deux molécules d'adhésion : une modification locale de l'adhésion serait placée à l'endroit du développement de l'axone (cf. 2.2.2 page 59).
- Des micropatterns jouant uniquement sur la géométrie des emplacements d'une unique molécule d'adhésion non spécifique.

Nous avons choisi d'utiliser des substrats à une molécule d'adhésion, avec des géométries originales. Dans la littérature, une méthode de ce type a été exposée mais les résultats ont été controversés (cf. 2.2.2 page 60). Nous avons donc étudié les propriétés connues de la différenciation axonale afin d'adapter la géométrie des micropatterns en conséquence, en s'aidant des résultats publiés sur l'influence des différentes géométries des micropatterns sur les cellules (cf. 2.1.3 page 51). Nous avons ainsi exploité deux propriétés de la différenciation axonale : l'importance du positionnement des organites cellulaires (cf. 1.3.1 page 31) et de la tension lors de la différenciation (cf. 1.3.2 page 36). Avec le succès de ces patterns, des perspectives passionnantes sur les mécanismes fondamentaux de la différenciation axonale se sont ouvertes. Mon travail s'est donc réorienté vers l'étude de la différenciation axonale et de ses mécanismes. Ces patterns sont de formidables outils, simples d'utilisation, pour un contrôle de la différenciation axonale de chaque neurone d'un réseau.

Nous aborderons tout d'abord dans cette partie notre matériel et méthodes. Notre idée de base pour le contrôle de la différenciation ainsi que l'étude d'une contrainte cellulaire appliquée sur le soma seront détaillées. Les contraintes sur les neurites créées par des géométries originales seront ensuite abordées pour conclure enfin sur le succès du motif alliant les deux types de contraintes.

Chapitre 3

Matériel et Méthodes

Sommaire

3.1	Nos substrats	69
3.1.1	Traitement de surface : la silanisation	69
3.1.2	La définition du réseau	72
3.2	Culture de neurones et techniques biologiques	73
3.2.1	Culture de neurones d'hippocampe de souris	73
3.2.2	Les marquages sur cellules fixées	74
3.2.3	Les transfections et la vidéomicroscopie	76
3.3	Méthodes statistiques	78
3.3.1	Trouver l'intervalle de confiance à 95% d'un pourcentage observé . . .	78
3.3.2	Comparer un pourcentage observé à un pourcentage théorique	78
3.3.3	Comparer deux pourcentages observés	78
3.4	Les programmes élaborés	80
3.4.1	Programme de découpage de photo et de tri automatique : programme labview	80
3.4.2	Reconnaissance de la forme des neurites et calcul des angles γ_1 et γ_2 .	81
3.4.3	Programme d'aide pour la détermination de la position du centrosome par rapport au motif : programme labview vision	84

3.1 Nos substrats

Nos substrats sont des lamelles de verre qui sont pour la plupart de forme carré de 18mm ou 15mm de côté mais nous avons également utilisé des lamelles rondes de diamètre variable selon les utilisations souhaitées (entre 25 et 29mm de diamètre). Nous nous les procurons chez Weissgläser. La première étape, détaillée dans le premier paragraphe, consiste à rendre le substrat hydrophobe. Le seconde étape permet de définir la géométrie des patterns. Grâce à un procédé de photolithographie, les zones destinées à être non adhérentes seront recouvertes d'une résine. A la fin de ces deux étapes, notre substrat se présentera donc comme indiqué dans la figure 3.1

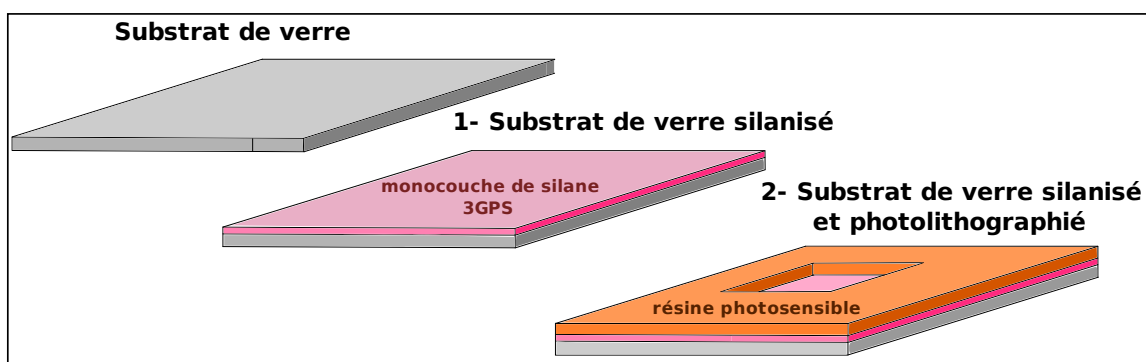


FIGURE 3.1: **Schéma des deux étapes de préparation du substrat avant culture.** 1/ Première étape : traitement de surface, rendant le substrat hydrophobe. 2/ Seconde étape : Dépôt et ouverture localisée par photolithographie d'une résine photosensible. Les zones recouvertes par la résine seront les zones non adhérentes du pattern.

3.1.1 Traitement de surface : la silanisation

La silanisation est une réaction permettant de fonctionnaliser une surface en la rendant hydrophobe. Elle consiste à former une monocouche de molécules amphiphiles appelées silanes, de formule générique $R-(CH_2)_n-SiX_3$. R est un groupe fonctionnel tel qu'amino, methacryloxy ou epoxy par exemple. X est un groupement hydrolysable. La longueur de leur chaîne carbonée, n, peut varier, rendant le silane plus ou moins hydrophobe.

Le silane utilisé

Nous avons choisi d'utiliser le 3GPS (3-glycidoxypropyl- dimethoxysilane), de formule chimique $C_9H_{20}O_5Si$ car son utilisation pour créer des zones non adhérentes pour les neurones a été démon-

trée (Nam Y, 2006). Les étapes du greffage de ce silane sur le verre sont indiquées figure 3.2. Ce silane avait pour avantage de présenter un bon compromis entre une hydrophobicité suffisante empêchant les neurones d'adhérer, mais non trop importante pour permettre à la résine d'adhérer lors de l'étape de photolithographie présentée dans le paragraphe suivant.

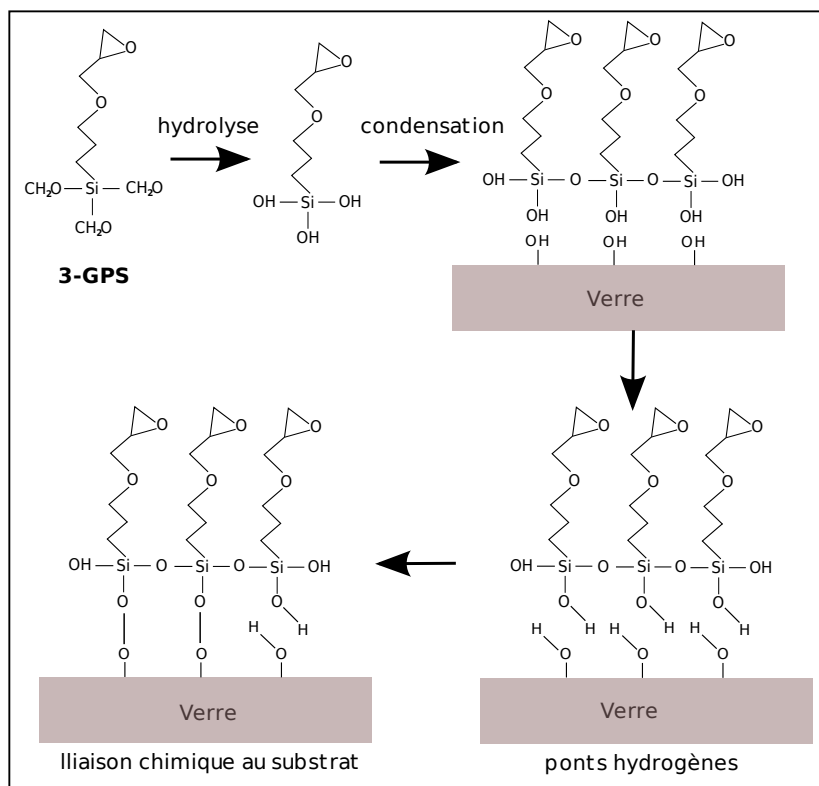


FIGURE 3.2: Schéma des étapes du greffage du 3GPS sur la surface de verre

Protocole de silanisation

La silanisation est délicate puisqu'en présence d'eau, les silanes forment des micelles. Après plusieurs échecs de silanisation, nous avons élaboré un protocole afin d'éviter toute contamination de nos silanes par l'eau. Notre bouteille de silane est donc au maximum protégée des atmosphères humides. Elle est recouverte de parafilm, puis introduite dans un récipient lui même recouvert de parafilm, contenant du gel de silice déshydraté. Nous travaillons dans une boîte à gants sous atmosphère d'azote, en présence de silica gel. Le taux d'humidité est également contrôlé par un hydromètre pour être inférieur à 3%.

Détail du protocole :

Tout notre matériel est nettoyé, rincé à l'éthanol puis à l'acétone. Les lamelles de verre à silaniser sont également nettoyées puis passées au plasma O_2 pendant 30 secondes afin de les nettoyer de toute impureté. Elles sont ensuite disposées dans des boîtes de Petri, de sorte qu'elles ne se recouvrent pas. Tout le matériel nécessaire à la silanisation (silane, toluène, hydromètre, silica gel, boîtes de petri remplies de lamelles, et verrerie) est introduit dans la boîte à gants. Le silane utilisé provient de Sigma-aldrich, ref : 244511. Le toluène est anhydre à 98% (Sigma-aldrich, ref : 244511). Il convient donc de ne l'ouvrir, comme pour le silane, que dans la boîte à gant, une fois le taux d'humidité inférieur à 3%. L'air contenu dans la boîte à gant est chassé par l'arrivée d'azote. Lorsque le taux d'humidité est suffisamment bas (inférieur à 3%), le robinet d'azote est fermé. Pendant 30 min voire une heure, nous laissons agir le gel de silice et vérifions que la boîte est bien étanche. Le matériel est ensuite rincé au toluène, ainsi que les lamelles. Le mélange silane/toluène est ensuite réalisé (1mL de silane pour 100mL de toluène) et versé dans les boîtes de Petri. Nous laissons agir 20 min puis rinçons trois fois au toluène. Les bouteilles de toluène et silanes sont correctement refermées et recouvertes de parafilm. En salle blanche, les lamelles sont séchées à l'azote une à une.

Résultats

Afin de déterminer si la silanisation s'est déroulée correctement, une mesure de l'angle de contact avant et après silanisation est nécessaire (Fig 3.3/A). La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat. Plus l'angle de contact est important, plus la surface est hydrophobe. Après l'étape du plasma, l'angle de contact est quasi nul puisque la goutte s'étale complètement sur la surface de verre. Avec notre protocole, il mesure typiquement après silanisation 60° (Fig 3.3/B).

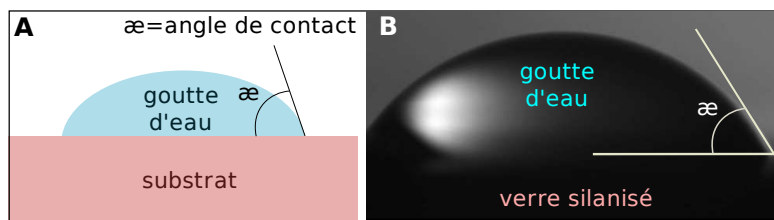


FIGURE 3.3: **Mesure de l'angle de contact.** A/ Principe de la mesure de l'angle de contact. B/ Goutte d'eau déposée sur un substrat de verre silanisé avec du 3-GPS.

3.1.2 La définition du réseau

Le principe de la photolithographie a été expliqué dans la section 2.3 à la page 50. Notre protocole est ici détaillé.

Les masques utilisés

Les masques utilisés sont des masques en quartz, de résolution $1\mu\text{m}$. Les géométries sont dessinées sur ordinateur grâce aux logiciels, Graphite, Clewin et Elphy. Les lignes pour le développement des neurites mesurent typiquement de $2\mu\text{m}$ en largeur. L'espacement entre deux plots est le plus souvent de $150\mu\text{m}$ mais peut aller jusqu'à $170\mu\text{m}$.

Protocole de photolithographie

Le protocole de photolithographie se déroule en salle blanche. Les lamelles silanisées sont recouvertes de $0,5\mu\text{m}$ de résine S1805 (résine positive, Shipley). Cette étape est réalisée sur une tournette, en recouvrant la lamelle de résine et en la faisant tourner à $4000\text{tr}/\text{min}$ pendant 30s. La lamelle recouverte de résine est ensuite recuite sur une plaque chauffante à 115°C pendant 1min. Elle est ensuite placée dans un aligneur UV (Karlsüss KG München-Garching, équipé d'une lampe mercure, de puissance comprise entre 1 et $5\text{mW}/\text{cm}^3$). Après avoir placé le masque au contact de l'échantillon, la résine est insolée pendant 8s à $1\text{mW}/\text{cm}^3$ *. La lamelle insolée est ensuite trempée dans un développeur (Microposit tm Developer concentrate, Rohm Haas/ Electronic Materials) pendant 1 min puis rincée dans de l'eau désionisée. Le substrat possède donc maintenant des zones ouvertes (parties insolées) et des zones où il reste de résine. Pour éviter tout reste de résine dans les zones ouvertes, la lamelle est exposée à un plasma O_2 pendant 15s.

*. Le temps d'exposition est défini par la résine. La dose UV de la S1805 est de $15\text{mJ}/\text{cm}^2$. Il convient de mesurer la puissance de la lampe à mercure avant insolation et de déterminer le temps nécessaire pour que la résine reçoive la dose UV adéquate. Des ajustements de temps peuvent être ensuite réalisés autour de cette valeur selon les géométries souhaitées.

3.2 Culture de neurones et techniques biologiques

3.2.1 Culture de neurones d'hippocampe de souris

Les neurones que nous utilisons proviennent de l'hippocampe d'embryons de souris (Fig.3.4). Cette zone du cerveau nous fournit une population de neurones relativement homogène avec peu de cellules gliales[†]. Les neurones pyramidaux (nom provenant de la forme particulière pyramidale de leur soma) forment la majeure partie des neurones de l'hippocampe (plus de 80% de la population totale). Comme la plupart des neurones, les neurones pyramidaux ont un seul axone et plusieurs dendrites.

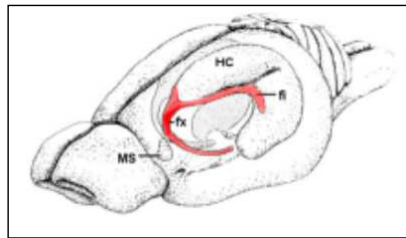


FIGURE 3.4: **Schéma d'un cerveau de souris.** L'hippocampe est indiqué en rouge.

Notre culture de neurones hippocampiques est réalisée à partir d'embryons de souris au 18ème jour de gestation selon le protocole de Banker et Goslin (ref?). A ce stade d'évolution, la production de neurones pyramidaux est quasiment terminée.

Protocole de culture

Préparation des boîtes des boîtes de cultures :

Nos substrats photolithographiés (Fig. 3.5/1) sortis de salle blanche sont placés dans des boîtes de culture de 35mm de diamètre et recouverts de polylysine (Poly-L-lysine, Iodobromide ; Sigma) diluée à 1mg/ml dans du tampon borate 0,1 M, pH 8,5 (Fig. 3.5/2). Après une nuit d'incubation à température ambiante, les boîtes sont rincées à l'eau stérile pendant une heure. Les substrats sont placés chacun à leur tour dans un récipient en verre rempli d'éthanol à 90%, puis soumis à des ultrasons pendant 2 min. Cette étape de lift-off permet de retirer la résine (Fig. 3.5/3). Nos substrats sont donc prêts à être ensemencés. Chaque substrat est ensuite remis dans une nouvelle

[†]. Une prolifération des cellules gliales n'est pas souhaitée dans nos patterns car non seulement les neurones peuvent se développer dessus mais en plus, elles sécrètent des protéines qui peuvent s'adsorber sur la surface non permissive, la rendant alors permissive.

boîte de culture B35, puis rincé deux fois à l'eau stérile. Enfin, 2 ml de milieu de culture DMEM (Invitrogen) / 10% SVF sont ajoutés et les boîtes de culture sont placées dans l'étuve à 37 ° C en atmosphère humide, contenant 5% CO₂.

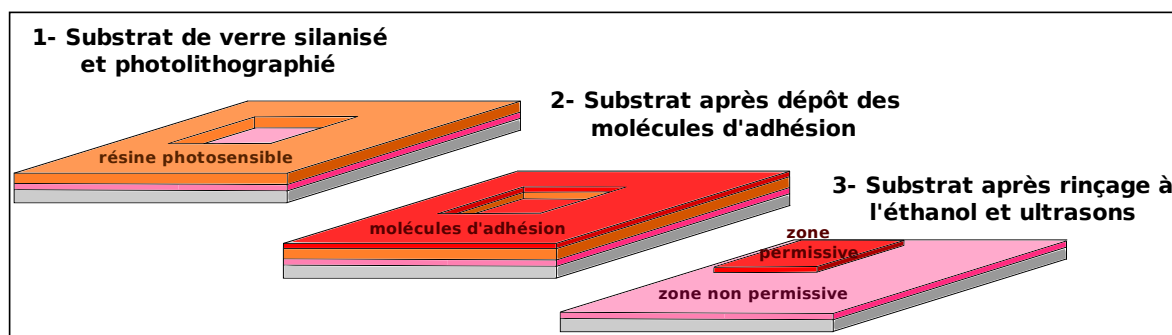


FIGURE 3.5: **Préparation des substrats avant culture.** 1/ Substrat à la fin de l'étape de photolithographie 2/ Substrat après incubation de la poly-L-lysine toute la nuit. 3/ Substrat après passage à l'éthanol et aux ultrasons, prêt à être ensemencé.

Obtention de la suspension de neurones d'hippocampe

Les neurones hippocampiques utilisés sont préparés à partir d'hippocampes d'embryons de souris âgés de 18,5 jours. Les hippocampes sont isolées sous une loupe binoculaire à l'aide de pinces fines et ciseaux, puis déposés dans 4,5 ml de milieu HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen). Les cellules subissent une dissociation chimique à la trypsine (trypsine 0,05% / EDTA 0,53 mM) à 37 ° C suivi d'une dissociation mécanique. La suspension cellulaire est ensuite déposée dans les boîtes de culture préalablement conditionnées, comme décrit ci-dessus. Une heure plus tard, le DMEM / SVF 10% est remplacé par du milieu Neurobasal / B-27 2% / Glutamax (Invitrogen). La culture est maintenue dans une étuve à 37 ° C en atmosphère humide contenant 5% CO₂ et complétée une fois par semaine avec du milieu frais contenant de l'AraC (Cytosine Arabinoside, 10 μ M). Cet agent antimétabolique bloque la prolifération des cellules gliales présentes dans les cultures de neurones primaires.

3.2.2 Les marquages sur cellules fixées

Les marquages sur cellules fixées consistent à marquer en fluorescence des protéines d'intérêt. Ceci est réalisé grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques à la protéine d'intérêt appelés anticorps primaires. Dans certains cas, l'anticorps primaire peut être couplé au fluorochrome. Le plus souvent cependant, un anticorps secondaire spécifique de l'IgG de l'anticorps primaire et couplé à une

molécule fluorescente est utilisé.

Les fixations

La méthode de fixation peut différer car certaines fixations masquent l'antigène et empêchent sa reconnaissance par l'anticorps. Trois types de protocole de fixation ont été utilisés :

- le méthanol : Les lamelles sont incubées 7 minutes dans du méthanol anhydre à -20 ° C. Ce solvant organique dissout les lipides, déshydrate les cellules et précipite les protéines en respectant l'architecture cellulaire.

- la paraformaldéhyde : les lamelles sont incubées à 37 ° C pendant 20 minutes avec une solution de PFA/Sucrose (paraformaldéhyde 4%, saccharose 120mM, qsp PBS). Après 2 lavages dans du PBS, les cellules sont perméabilisées 5 minutes dans du PBS / Triton X-100 0,2%. Le Triton est ensuite éliminé par 2 lavages successifs avec du PBS. La PFA forme des ponts intermoléculaires et préserve mieux les structures membranaires que le méthanol.

- protocole pour l'utilisation de la γ tubuline, protéine marquant le centrosome.

Les lamelles sont incubées à température ambiante pendant 30 minutes avec une solution de PFA/GA/triton (paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0,5%, Triton-X100 0,1% dilué dans du PBS). Après trois lavages rapides dans deux grands bacs remplis de PBS, une solution de PBS+NaBH₄ (1mg/mL) est déposée sur les lamelles pendant 10 min. Cette solution est ensuite éliminée par deux lavages successifs au PBS puis un lavage au PBS Triton 0,1%.

Immuno-fluorescence

Pour les fixations méthanol et paraformaldéhyde, nous utilisons le protocole suivant. Après réhydratation des cellules dans du PBS - Tween 20 0,1% (PBS-T), les lamelles sont recouvertes d'une solution de PBS-T contenant les anticorps primaires pendant une heure à température ambiante. Les lamelles sont ensuite lavées dans du PBS-T puis sont incubées 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité avec l'anticorps secondaire (dilué dans du PBS-T). L'ADN des cellules est ensuite coloré avec un agent intercalant, l'Hoescht 33258 (1 μ g/ml) pendant cinq minutes. Les lamelles sont déshydratées dans de l'éthanol et montées sur des lames de verre à l'aide du liquide de montage FluorSave™ (Calbiochem). Les cellules sont observées au microscope (Zeiss, Axioscope) et les acquisitions d'images sont effectuées à l'aide d'une caméra CCD (CoolSnap ES, Roper Scientific) pilotée par le logiciel Metavue (Universal Imaging Corporation).

Dans le cas particulier de l'utilisation de la γ tubuline, le protocole diffère légèrement. La

dilution des anticorps ainsi que les lavages intermédiaires s'effectuent dans du PBS-Triton 0,1% au lieu du PBS-Tween 0,1%. A la fin de l'immunofluorescence, les lamelles sont trempées dans de l'eau bi-distillée assez rapidement puis sont séchées à l'air libre sur du papier. Elles sont ensuite montées sur lames de verre avec du liquide de montage Dako.

Les anticorps utilisés

La liste des anticorps primaire utilisés est indiquée dans le tableau 3.2.2

Nom de l'anticorps	Fournisseur	Protéine marquée et localisation	Espèce	Dilution
ankyrin G	Santa Cruz	ankyrin G : protéine concentrée au niveau du segment initial de l'axone	souris	1/100
Y1 1/2	produit au laboratoire	Tubuline tyrosinée	rat	1/10 000
Giantine	Covance	Giantine : protéine membranaire de l'appareil de Golgi	lapin	1/1000
γ tubuline	don par Michel Bornens	γ tub, concentrée au niveau du centrosome	lapin	1/100
β III tubuline	Chemicon	Tubuline	souris	1/500

Les anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les IgG de lapin, de rat ou de souris couplés à la Cyanine 3 (dilution au 1/1000; Molecular Probes), à la Cyanine 5 (dilution au 1/500; Molecular Probes), à l'Alexa Fluor 488 (dilution au 1/500; Molecular Probes)

Pour le marquage de l'actine, nous utilisons de la phalloïdine texas red (Molecular Probes), placées en même temps que les anticorps primaires. Pour le marquage du noyau, nous utilisons de l'hoechst (Sigma), intercalant de l'ADN à la fin de l'immunofluorescence.

3.2.3 Les transfections et la vidéomicroscopie

Les transfections

Les transfections permettent d'introduire une séquence d'ADN codant pour une protéine d'intérêt couplée à un fluorophore. Ainsi, la cellule synthétisera cette protéine d'intérêt fluorescente. Si par exemple elle se localise principalement au niveau du centrosome, il sera alors possible, avec un microscope à fluorescence de repérer cet organite. Nous avons utilisé des transfections Amaxa qui consistent à électroporer[‡] l'ADN à l'intérieur de la cellule avant l'ensemencement sur les substrats.

‡. L'électroporation consiste à appliquer des impulsions électriques contrôlées sur des cellules vivantes afin de perméabiliser la membrane cellulaire. Cette technique permet d'introduire de façon simple, rapide et efficace de nombreux types de molécules dans de nombreux types de cellules. Dans notre cas, elle permet d'introduire des séquences ADN.

Protocole Amaxa :

Nous utilisons le Mouse Hippocampal Nucleofector kit (Amaxa) ainsi que l'appareil Amaxa d'électroporation. Les transfections Amaxa sont réalisées entre la dissociation des hippocampes et l'ensemencement lors de la culture. Les neurones fraîchement dissociés dans le DMEM sont centrifugés à 640rpm pendant 5min afin de séparer les cellules du DMEM (les cellules se retrouvent alors dans le culot). Le surnageant est ensuite retiré, en veillant à laisser une fine pellicule de milieu. 100 μ L solution de nucleofector (solution de Mouse nucleofector+ supplément mouse nucleofector medium fournit dans le kit) est ensuite ajoutée aux cellules. Celles-ci sont remises en suspension. Le plasmide est ensuite ajouté et mélangé à son tour (entre 1 μ g et 3 μ g). La suspension cellulaire est transférée dans la cuvette Amaxa en évitant les bulles d'air puis insérée dans l'appareil d'électroporation. Le programme O-005 (mouse hippocampal neurons) est ensuite lancé. L'électroporation dure quelques secondes. La cuvette est toute de suite enlevée et la suspension cellulaire transférée dans un eppendorf. 500 μ L de DMEM à 37 ° C sont ajoutés et les cellules sont remises en suspension. Les cellules sont ensuite ensemencées dans les boîtes de culture préparées comme décrits dans la partie 3.2.1 page 73

plasmides utilisés :

- centrine GFP, Séquence d'ADNc codant pour la protéine centrine
- inversine GFP, Séquence d'ADNc codant pour la protéine inversine

La Vidéomicroscopie

Des vidéomicroscopies de neurones en contraste de phase ou en fluorescence ont été réalisées grâce à une station équipée d'un microscope Zeiss Axovert 200M, d'une lampe au mercure (Atto arc HBO100 W) et d'une caméra Cool Snap HQ photometrics. Une chambre d'incubation équipée de contrôleurs température et CO₂ permet de maintenir une température constante de 37 ° C et un pourcentage de CO₂ de 5%. Du multipositionnement ainsi que du Z-series peuvent être réalisés grâce à une platine motorisée (maxhauser) ainsi qu'un piezo (E662 Amplifier. servo LVPZT) pilotés par le logiciel Metamorph.

3.3 Méthodes statistiques

Les outils statistiques s'appliquant aux grands échantillons ont été utilisés. Pour que l'on se trouve dans ce cas, il faut que $N.p$ et $N.q$ soit supérieur ou égaux à 5 (N est le nombre d'échantillons, p le pourcentage observé et $q=1-p$).

3.3.1 Trouver l'intervalle de confiance à 95% d'un pourcentage observé

Les bornes inférieures (p_i) et supérieure (p_s) de l'intervalle de confiance à 95% sont calculées grâce à la formule 3.1. Cela signifie que pour un pourcentage p observé sur N échantillons, nous avons 95% de chance que la valeur réelle de ce pourcentage se situe entre p_i et p_s .

$$[p_i ; p_s] = p \pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{p \cdot q}{N}} \quad (3.1)$$

3.3.2 Comparer un pourcentage observé à un pourcentage théorique

Pour déterminer si un pourcentage p_0 observé sur N échantillons est significativement différent d'un pourcentage théorique p , nous utilisons la formule 3.2 qui permet de calculer ϵ , l'écart réduit. Cet écart réduit nous permet de déterminer α le risque correspondant grâce à la table de la figure 3.6. Celui-ci fixe le degré de signification.

$$\epsilon = \frac{p_0 - p}{\sqrt{\frac{p \cdot q}{N}}} \quad (3.2)$$

D'après le seuil conventionnel des 5%, si $\epsilon < 1,96$, la différence n'est pas significative, si $\epsilon > 1,96$, la différence est significative, avec pour risque α .

3.3.3 Comparer deux pourcentages observés

Pour déterminer si deux pourcentages observés p_A et p_B sur respectivement N_A et N_B échantillons sont significativement différents, nous calculons l'écart réduit défini par la formule 3.3. p et q sont les proportions évaluées sur l'ensemble des deux échantillons définies par les formules 3.4. De même que pour le paragraphe précédent, l'écart réduit ϵ nous permet de définir le risque α , fixant le degré de signification. De même également, si $\epsilon < 1,96$, la différence n'est pas significative, si $\epsilon > 1,96$, la différence est significative, avec pour risque α .

α	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,00	α	2,576	2,326	2,170	2,054	1,960	1,881	1,812	1,751	1,695
0,10	1,645	1,598	1,555	1,514	1,476	1,440	1,405	1,372	1,341	1,311
0,20	1,282	1,254	1,227	1,200	1,175	1,150	1,126	1,103	1,080	1,058
0,30	1,036	1,015	0,994	0,974	0,954	0,935	0,915	0,896	0,878	0,860
0,40	0,842	0,824	0,806	0,789	0,772	0,755	0,739	0,722	0,706	0,690
0,50	0,674	0,659	0,643	0,628	0,613	0,598	0,583	0,568	0,553	0,539
0,60	0,524	0,510	0,496	0,482	0,468	0,454	0,440	0,426	0,412	0,399
0,70	0,385	0,372	0,358	0,345	0,332	0,319	0,305	0,292	0,279	0,266
0,80	0,253	0,240	0,228	0,215	0,202	0,189	0,176	0,164	0,151	0,138
0,90	0,126	0,113	0,100	0,088	0,075	0,063	0,050	0,038	0,025	0,013

La probabilité α s'obtient par addition des nombres inscrits en marge

Exemple : Pour $\epsilon = 1,960$ la probabilité $\alpha = 0,00 + 0,05 = 0,05$

Table pour les petites valeurs de la probabilité

α	0,001	0,000 1	0,000 01	0,000 001	0,000 000 1	0,000 000 01	0,000 000 001
ϵ	3,290 53	3,890 59	4,417 17	4,891 64	5,326 72	5,730 73	6,109 41

FIGURE 3.6: Table de correspondance entre l'écart réduit ϵ et le risque α .

$$\epsilon = \frac{p_A - p_B}{\sqrt{\frac{p \cdot q}{N_A} + \frac{p \cdot q}{N_B}}} \quad (3.3)$$

$$p = \frac{p_A \cdot N_A + p_B \cdot N_B}{N_A + N_B}, q = 1 - p \quad (3.4)$$

3.4 Les programmes élaborés

Trois programmes ont été conçus pour faciliter les traitements de données. Les deux premiers programmes, *labview vision* et *matlab*, permettent d'étudier la forme réelle des neurites sur les motifs dont trois des quatre chemins sont ondulés. Le premier permet de découper et de trier les photos qui seront traitées par le second programme. Le troisième programme permet quant à lui de traiter le plus précisément et rapidement possible nos données sur la position du centrosome par rapport au motif sur lequel les neurones ont été cultivés.

3.4.1 Programme de découpage de photo et de tri automatique : programme *labview*

Un programme de découpage et tri de photos semi-automatique a été réalisé sous *labview vision*. Le but de ce programme est de disposer de la première ondulation de chaque neurite s'étant développé sur des chemins ondulés et de les classer selon leur identité d'axone ou de dendrite (Fig 3.7).

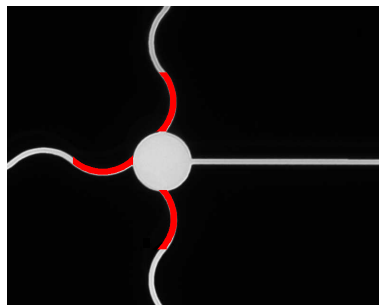


FIGURE 3.7: **Motif typique sur lequel les neurones ont été cultivés.** Seules les premières ondulations, colorées ici en rouge, nous intéressent.

Les données de base sont des photos en fluorescence de neurones cultivés sur les motifs de la figure 3.7. Pour chaque neurone, nous disposons des photos de la tubuline tyrosinée (marquant le squelette de la cellule) et de l'ankyrin G (marquant le segment initial de l'axone) (Fig 3.8). Le programme dispose d'une interface semi automatique (Fig 3.9) permettant de placer correctement le neurone par rapport aux lignes de repères du motif afin de découper les premières ondulations. Il permet également de définir quel neurite est l'axone. Les détails du programme sont exposés dans la figure 3.9. A la fin de l'exécution du programme, l'opérateur dispose de deux fichiers. Un fichier 'axone' et un fichier 'dendrites' dans lesquels se trouvent respectivement les photos des premières

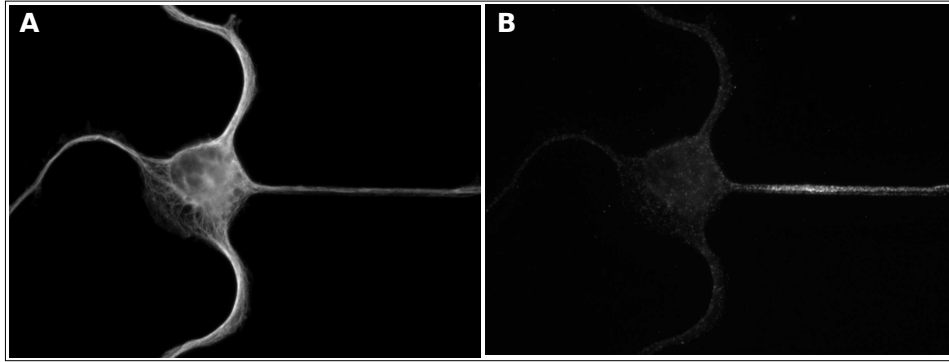


FIGURE 3.8: **Exemple de donnée brute pour le programme de découpage et de tri.** A/ Photo en fluorescence de la tubuline tyrosinée. B/ Photo en fluorescence de l'ankyrin G.

ondulations des axones et des dendrites développés sur les chemins ondulés.

3.4.2 Reconnaissance de la forme des neurites et calcul des angles γ_1 et γ_2

Principe du programme

Un programme matlab a été réalisé afin de pouvoir calculer de façon automatique, à partir de photographies en fluorescence de neurites, les angles γ_1 et γ_2 indiqués sur la figure 3.11, ainsi que le coefficient $\alpha = \cos\gamma_1 + \cos\gamma_2$. Les données brutes sont les photos découpées par le programme de découpage et de tri exposé dans le paragraphe précédent.

Détection de la forme du neurite

Une première étape du programme consiste à détecter la forme du neurite. Avant tout, le programme détecte si le neurite est vertical ou horizontal grâce à la taille de l'image découpée dans le programme précédent. Si le neurite est vertical, le programme travaillera ligne par ligne, sinon colonne par colonne. Prenons l'exemple d'un neurite vertical. Pour chaque ligne, le programme juge l'épaisseur du neurite, ce qui lui fournit un intervalle de travail. Le programme fait ensuite glisser cet intervalle le long ligne, en se déplaçant de 1 pixel à chaque itération. Pour chacune de ces itérations, la somme des pixels compris dans l'intervalle est sommée, et enregistrée. L'endroit où la somme des pixels de l'intervalle est la plus grande est l'endroit où l'on détecte le neurite. La position du neurite est ensuite définie comme au milieu de l'intervalle.

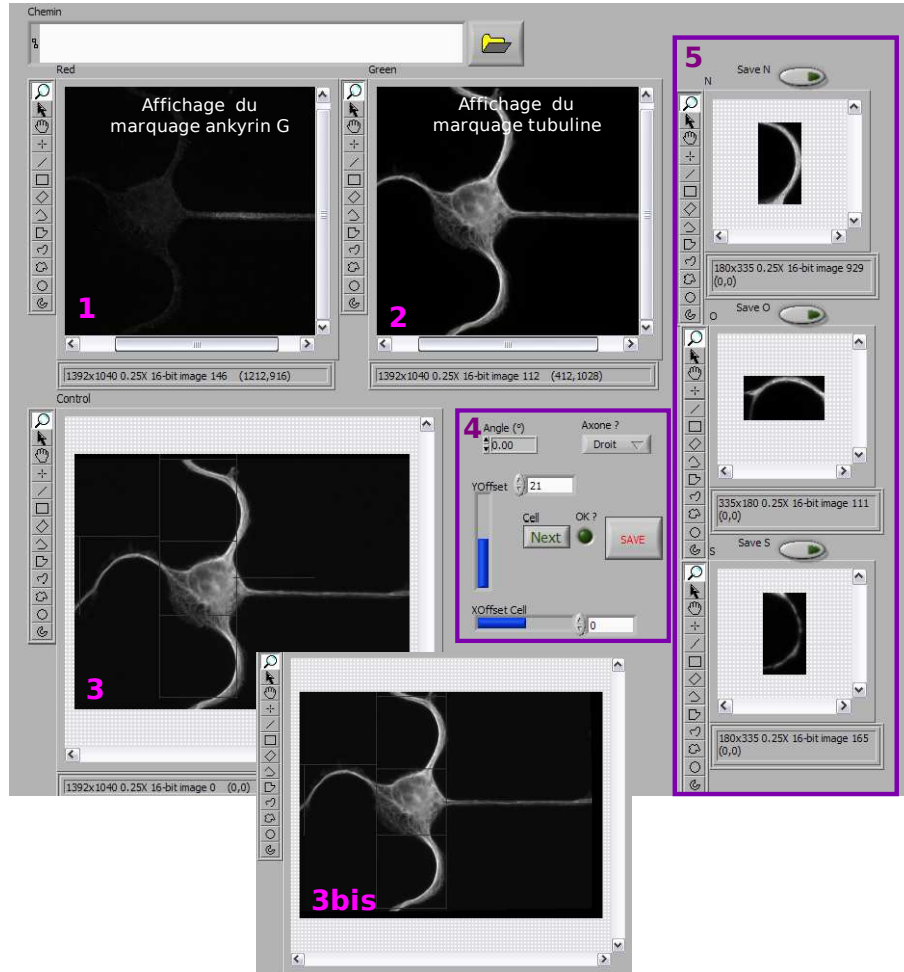


FIGURE 3.9: **Principe du programme de découpage et de tri des photos.** Après avoir défini le fichier dans lequel se trouvent les photos à étudier, le programme affiche dans son interface, neurone après neurone, les photos traitées de la tubuline et celle de l'ankyrin dans les parties 1 et 2 de l'interface. Le traitement consiste à appliquer une Look Up Table (LUT) dont le principe est indiqué dans la figure 3.10. Nmin et Nmax sont déterminés automatiquement comme les niveaux de gris le plus bas et le plus haut de l'image avant traitement. La photo de la tubuline est également affichée dans la partie 3 de l'interface avec les lignes de repères du motif surimposées. La photo peut être manuellement translatée et tournée dans la partie 4 de l'interface par rapport aux lignes de repère du motif afin de la placer correctement. Le résultat de cette étape est indiqué dans notre exemple dans la partie 3bis. Il s'agit maintenant de définir l'identité de chaque neurite, en indiquant le position de l'axone, grâce à l'onglet en haut à droite de la partie 4 de l'interface. Les trois portions de la photo correspondants aux premières ondulations de chaque chemin ondulé sont ensuite découpées et affichées dans la partie 5 de l'interface. L'opérateur possède le choix d'enregistrer chacune des portions de neurites. Celles enregistrées seront ensuite classées selon leur identité dans un fichier axone ou dendrite.

Calcul des angles γ_1 , γ_2 et α .

Pour calculer les deux angles γ_1 et γ_2 , le début et la fin de la courbe détectée sont respectivement lissées par deux polynômes du second degré. Les tangentes au début de la courbe et à la fin

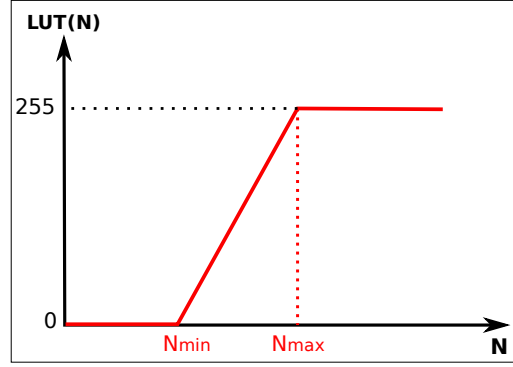


FIGURE 3.10: **Principe du traitement d'image avec une Look Up Table (LUT).** La LUT est une fonction qui permet de modifier chaque niveau de gris des pixels d'une image. Celle que nous utilisons est représentée dans cette figure. En abscisse se trouvent les différentes valeurs des niveaux de gris que peuvent avoir les pixels de l'image avant traitement. En ordonnée les niveaux de gris de l'image traitée. N_{min} et N_{max} sont définis par l'utilisateur. Si la valeur N du niveau de gris d'un pixel de l'image non traitée est inférieure à N_{min} , sa valeur dans l'image traitée sera égale à 0. Si la valeur N du niveau de gris d'un pixel de l'image non traitée est supérieure à N_{max} , sa valeur dans l'image traitée sera égale à 255. Si la valeur N du niveau de gris d'un pixel de l'image non traitée est comprise entre N_{min} et N_{max} , sa valeur dans l'image traitée sera égale à $\frac{N-N_{min}}{N_{max}-N_{min}}$.

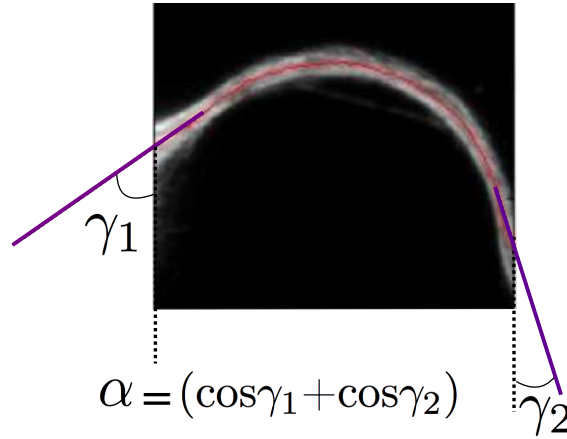


FIGURE 3.11: γ_1 , γ_2 et α d'un neurite. Photographie en fluorescence de la première ondulation d'un neurite avec la détection de sa forme. Les angles γ_1 et γ_2 que doit calculer le programme sont indiqués.

sont ensuite calculées, puis les angles que ceux-ci forment avec la verticale. Enfin, le coefficient α est calculé. A la fin du traitement de toutes les images, le programme crée un fichier Résultat où sont enregistrés un tableau récapitulatif tel qu'indiqué dans la figure 3.12/A ainsi qu'une image du type de la figure 3.12/B pour chaque neurite.

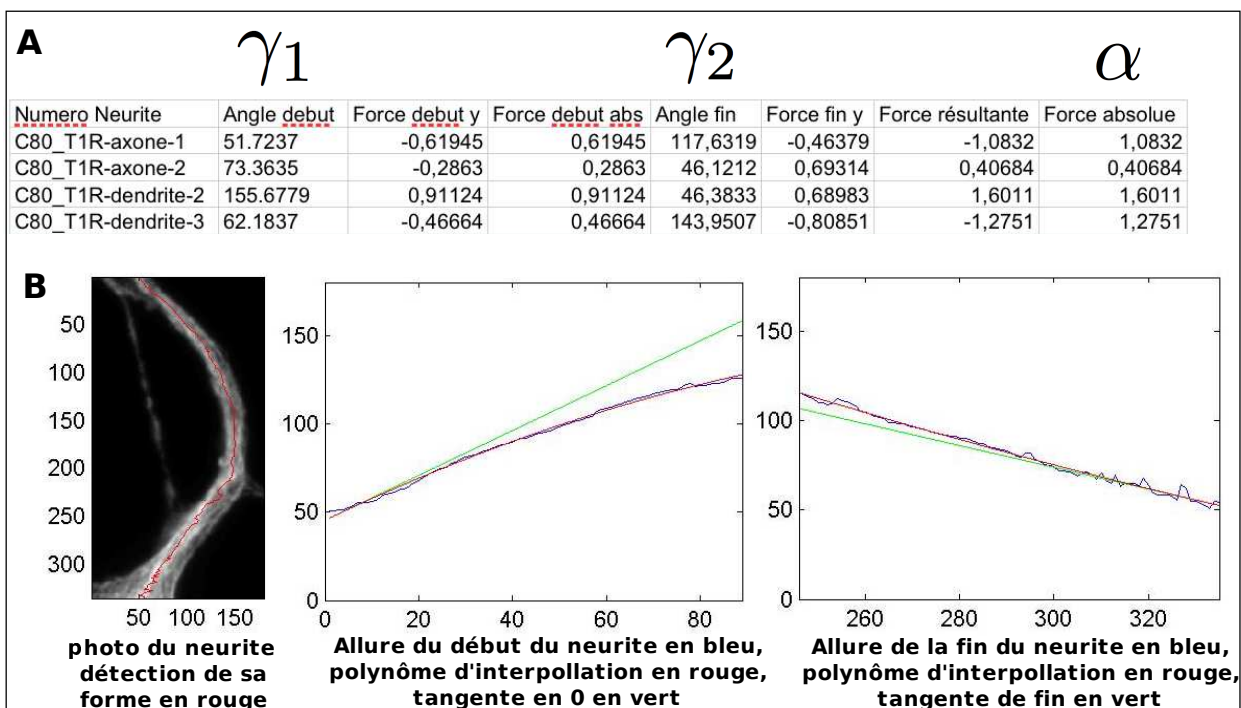


FIGURE 3.12: Données enregistrées à la fin du programme. A/ Tableau récapitulatif des données calculées dans le fichier traité. B/ Figure type sauvée pour chaque neurite.

Commentaires

Pour le cas des neurites dédoublés (Fig 3.12), le programme est conçu pour ne suivre qu'un neurite. Si le neurite est une dendrite, le programme suit le neurite le plus intense. Par contre, dans le cas d'un axone, nous forçons le programme à suivre le neurite marqué ankyrin G.

3.4.3 Programme d'aide pour la détermination de la position du centrosome par rapport au motif : programme labview vision

Le but de ce programme est de déterminer la position du centrosome de chaque neurone photographié par rapport à des zones d'intérêts définies pour chaque motif. Pour cela, il crée et enregistre une photo pour chaque neurone sur laquelle se trouvent l'addition des marquages du squelette de la cellule et du centrosome avec les zones d'intérêts correctement placées. Les données brutes sont des photos en fluorescence de neurones cultivés sur tous nos types de motifs. Pour chaque neurone, nous disposons des photos de la tubuline tyrosinée (marquant le squelette de la cellule) et de la γ tubuline ou de la centrine (marquant le centrosome) (Fig 3.13).

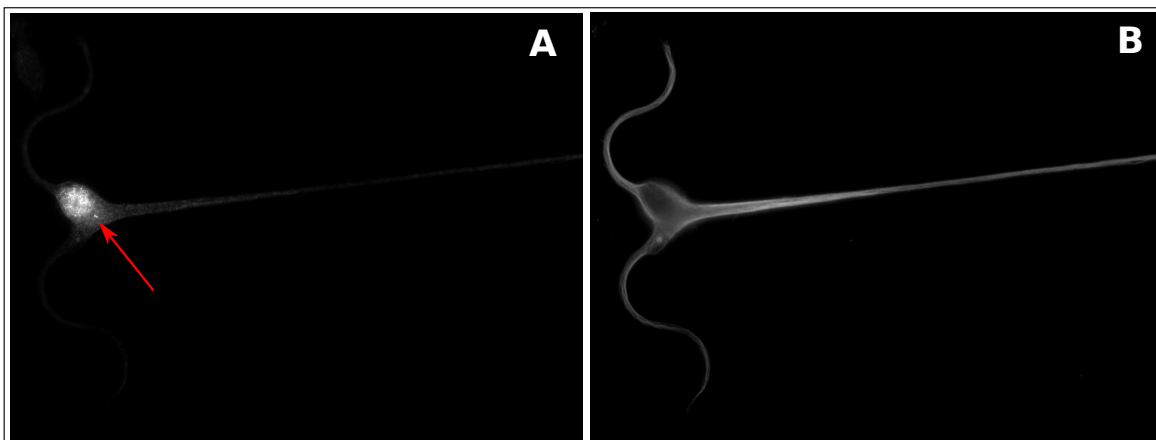


FIGURE 3.13: **Exemple de donnée brute avant passage dans le programme.** A/ Photo en fluorescence de la γ tubuline, marquant le centrosome (flèche). B/ Photo en fluorescence de la tubuline tyrosinée.

Principe du programme

Le programme dispose d'une interface semi automatique (voir Fig 3.14) qui permet de placer correctement le neurone par rapport aux zones d'intérêts. Les explications détaillées des différentes étapes sont fournies dans la figure 3.14.

Les lignes de repères pour chaque pattern

Le point délicat de ce programme est de placer correctement les photos selon l'emplacement des lignes de repères du motif. C'est pourquoi, le maximum de lignes de repères possibles ont été définies grâce à des photos pour chaque motif. La figure présente les photos des motifs avec les lignes de repères et les zones de positionnement des centrosomes.

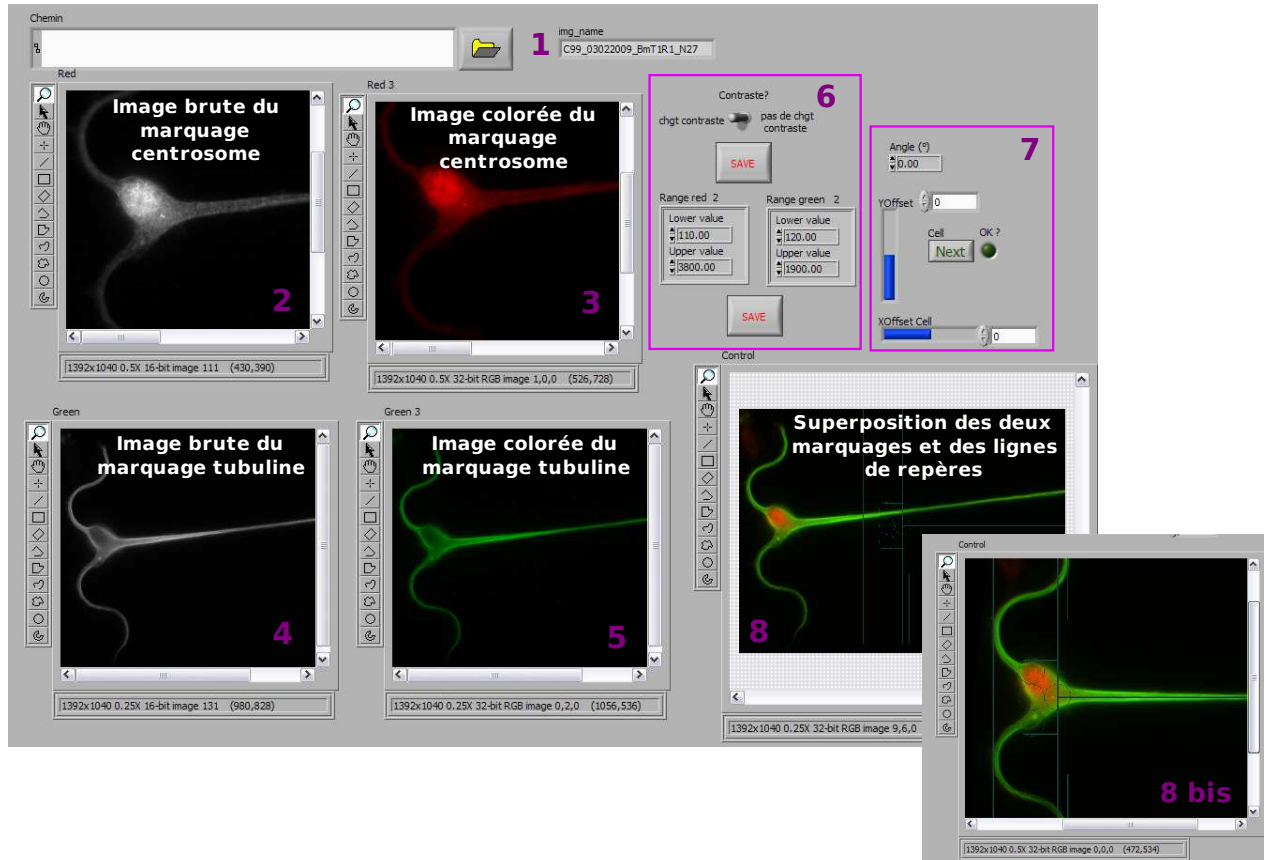


FIGURE 3.14: Principe du programme de positionnement du centrosome par rapport aux zones d'intérêts. Après avoir défini le fichier des photos à étudier, le programme affiche dans son interface, neurone après neurone (le nom de la photo traitée est affiché dans la partie 1 de l'interface), les photos brutes ainsi que colorées de la tubuline et celle de la γ tubuline ou de la centrine (marquant le centrosome) dans les parties 2, 3, 4 et 5 de l'interface. Un interrupteur permet de définir si un traitement d'image est nécessaire (Partie 6). Si non, le programme affiche directement l'addition des deux photos colorées. Si oui, une modification de la Lookup table de chacune de ces photos peut être contrôlée manuellement en indiquant N_{min} et N_{max} (voir explications dans la figure 3.10). Une photo de l'addition de ces deux photos arrangées est ensuite affichée dans la partie 8 de l'interface avec les lignes de repères du pattern surimposées, et les zones pour le placement des centrosomes. La photo peut être manuellement translatée et tournée par rapport aux lignes de repère du motif grâce à la partie 7 de l'interface afin de placer correctement le neurone par rapport au motif. Une fois positionnée selon les lignes du motif (un exemple est fourni dans la partie 8bis), il suffit alors de repérer dans quelle zone se trouve le centrosome. La photo de l'addition de la tubuline et de la γ tubuline/centrine avec les lignes de repères est finalement enregistrée.

Chapitre 4

Premières idées et contrainte du corps cellulaire

Sommaire

4.1	Un motif contrôle : mise en place de notre méthodologie . .	89
4.1.1	Déterminer l'efficacité d'orientation d'un motif : la méthodologie . . .	89
4.1.2	Présentation du motif contrôle	90
4.1.3	Facteur d'orientation du motif contrôle : les résultats	91
4.2	Première idée : le motif boomerang BmA	93
4.2.1	Facteur d'orientation du motif	94
4.2.2	Questions ouvertes	95
4.3	Motif Cont-Bm et position du centrosome	97
4.3.1	La contrainte cellulaire du motif BmA : un nouveau motif Cont-Bm .	97
4.3.2	Facteur d'orientation du motif Cont-Bm	97
4.3.3	Position du centrosome	98
4.4	Vers une contrainte géométrique des neurites	102
4.4.1	La contrainte angulaire du motif BmA : un nouveau motif Cont-A . .	102
4.4.2	Facteur d'orientation	102
4.4.3	Une contrainte plus ou moins efficace	103

Pour les raisons évoquées dans l'introduction de la partie 2, nous avons choisi d'utiliser une molécule d'adhésion non spécifique. Les contraintes appliquées sur le neurone dans le but d'essayer de contrôler la position de l'axone sont donc uniquement géométriques par le biais de l'utilisation de micropatterns. Les motifs seront asymétriques afin de favoriser la pousse de l'axone dans une des directions. Dans une première section, nous définirons notre méthodologie puis exposerons la géométrie et les résultats obtenus pour notre motif contrôle, symétrique. Les trois sections suivantes détailleront un motif asymétrique et les deux types de contraintes qu'il a permis d'identifier.

4.1 Un motif contrôle : mise en place de notre méthodologie

Avant toute présentation des motifs que nous avons dessinés, la méthodologie que nous avons adopté pour déterminer l'efficacité d'orientation de ceux-ci est exposée. Le motif contrôle symétrique ainsi que ses résultats sont ensuite détaillés.

4.1.1 Déterminer l'efficacité d'orientation d'un motif : la méthodologie

Des cultures de neurones d'hippocampes de souris sont réalisées sur nos différents motifs. Nous les fixons à 6 jours de culture même si la différenciation axonale se déroule dans les neurones hippocampique en culture *in vitro* aux alentours de 2 à 3 jours après l'ensemencement. Ce choix a été arrêté car nous utilisons l'ankyrin G pour marquer l'axone, protéine concentrée au niveau du segment initial de l'axone. Ce marquage s'avérerait le plus pratique pour nous. En effet, non seulement ce marquage est très clair, contrairement aux autres marqueurs connus de l'axone mais, de plus, l'ankyrin G marque uniquement le segment initial. L'identification sans ambiguïté de l'axone pour une cellule donnée est alors possible même au sein d'un réseau, pour peu que le plot d'adhésion du soma ne soit occupé que par une seule cellule. Cependant, le pourcentage de cellules présentant un enrichissement de l'ankyrin G au niveau de leur segment initial n'est pas égal à 100%, mais augmente avec les jours de culture (Boiko T, 2007). Au bout de 6 jours de culture, ce pourcentage est de l'ordre de 60%. Il peut d'ailleurs varier suivant la densité de la culture (Boiko T, 2007).

Notre but est de quantifier le nombre de neurones ayant leur axone dans chaque direction possible de développement. Nous marquons donc nos cellules à 6 jours de culture avec de la tubuline tyrosinée marquant leur squelette, de l'ankyrin G pour déterminer l'axone, de l'hoechst pour repérer le noyau et donc le corps cellulaire (Fig 4.1). Le marquage du noyau nous permet

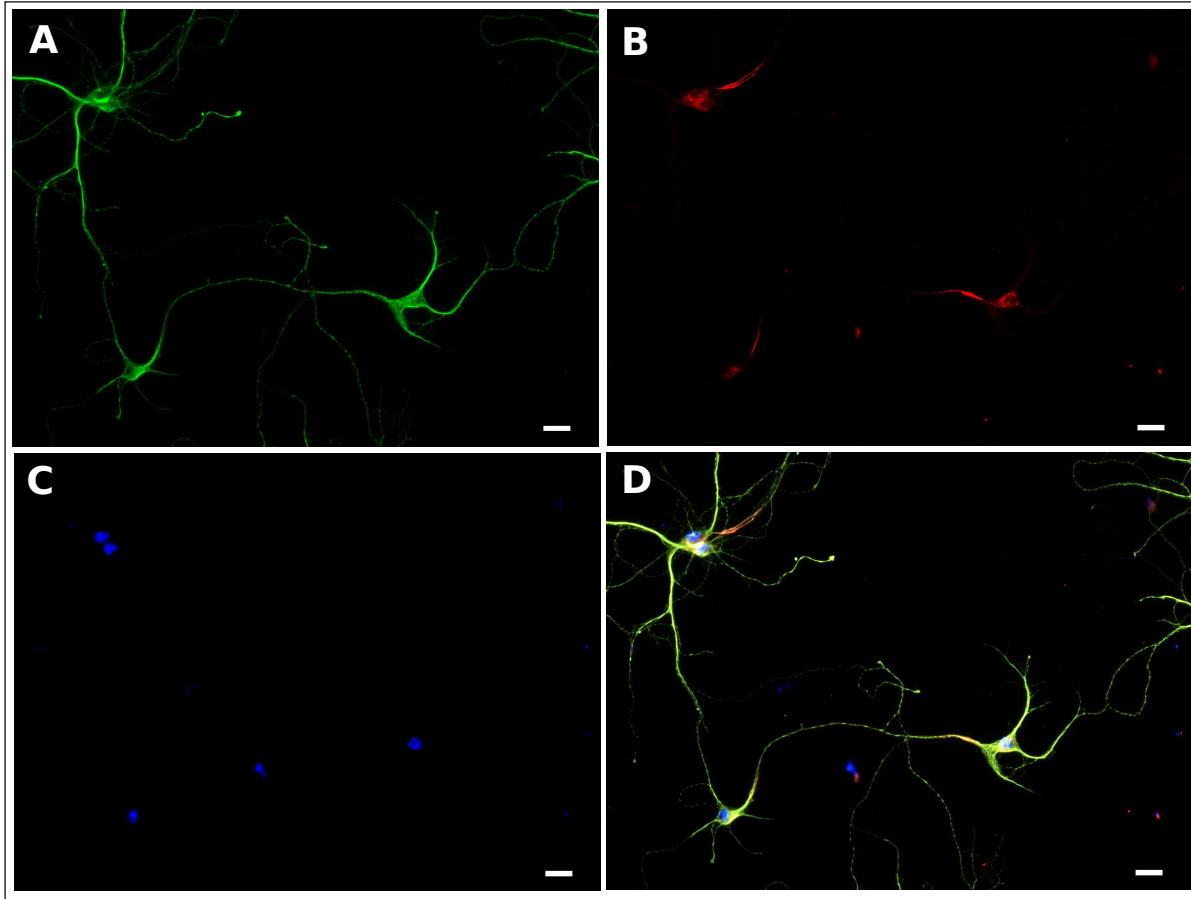


FIGURE 4.1: Exemple d'un marquage typique sur un réseau de neurones d'hippocampe de souris à 6 jours de culture. A/ Marquage de la tubuline tyrosinée. Le squelette de la cellule peut être distingué. B/ Marquage de l'ankyrin. Seuls les segments initiaux des axones sont marqués. Les axones peuvent être ainsi repérés. C/ Marquage du noyau grâce à l'intercalant à l'ADN : hoechst. D/ Superposition de la tubuline, de l'ankyrin et du noyau. Il est possible de distinguer quels axones appartiennent à quelles cellules dans un réseau. La barre d'échelle mesure $20\mu\text{m}$

de repérer quel motif est occupé par un unique neurone. En effet, chaque neurone correctement placé, seul sur un motif, et marqué ankyrin G est comptabilisé. Le fait qu'il ait établi ou non des connexions avec ses voisins n'est pas pris en compte. Toutes les lamelles sont ainsi scrutées à la recherche de ces neurones. Nous effectuons ces statistiques sur plusieurs cultures différentes.

4.1.2 Présentation du motif contrôle

Avant tout essai d'orientation de la position de l'axone par des motifs asymétriques, nous avons dessiné un motif symétrique, qui logiquement devrait conduire à l'absence d'orientation axonale. Cette étape est cruciale pour valider nos éventuels succès d'orientation de l'axone avec nos motifs

originaux. Ce motif 'contrôle' possède pour l'emplacement du corps cellulaire un plot rond de $20\mu\text{m}$ de diamètre duquel émergent quatre chemins pour les neurites (Fig 4.2/B). Notre but dans ce travail étant d'arriver à positionner l'axone de chaque neurone d'un réseau, tous nos motifs sont en fait insérés dans des réseaux de huit par huit motifs (Fig 4.2/A),

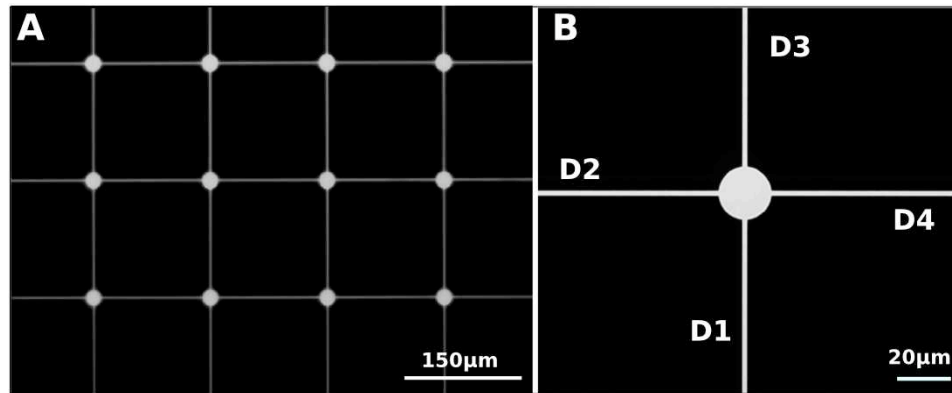


FIGURE 4.2: **Motif contrôle.** A/ Photo en transmission du motif contrôle en réseau. B/ Photo en transmission du motif contrôle. Les quatre directions possibles pour le développement des neurites sont indiquées. Le plot mesure $20\mu\text{m}$ de diamètre. Les lignes mesurent $2\mu\text{m}$ de largeur.

4.1.3 Facteur d'orientation du motif contrôle : les résultats

Pour notre motif contrôle, deux cultures différentes ont été étudiées. Un exemple des marquages que nous réalisons est présenté dans la figure 4.3. Le pourcentage de neurones marqués ankyrin est égal à 45%*. Les résultats de ces quantifications sont indiquées dans le tableau 4.1.

Nombre de Neurones	D1		D2		D3		D4	
160	41	25,6%	38	23,8%	36	22,5%	45	28,8%

TABLE 4.1: **Tableau récapitulatif de la position des axones de neurones à 6 jours de culture cultivés sur le motif contrôle selon quatre directions D1, D2, D3 et D4.** Le nombre de neurones comptabilisés (bien placés, seuls sur un plot et marqués ankyrin) est indiqué dans la première colonne. La valeur des pourcentages correspondant est indiquée dans les cellules grisées.

Dans le plus défavorable des cas, 28,8% des neurones ont leur axones dans une même direction. L'intervalle de confiance à 95% (voir section 3.3.1 page 78) est compris entre 21,8% et 35,8%. Nous voulons également définir si notre valeur est significativement différente de celle du pourcentage

*. Bien qu'une étude approfondie n'ait pas été réalisée, nous avons noté que pour ce motif symétrique, le taux de marquage ankyrin à 6 jours de culture est plus bas que pour tous les autres motifs étudiés dans ce travail. La rapidité de différenciation des neurones est-elle influençable par la géométrie du motif utilisée ?

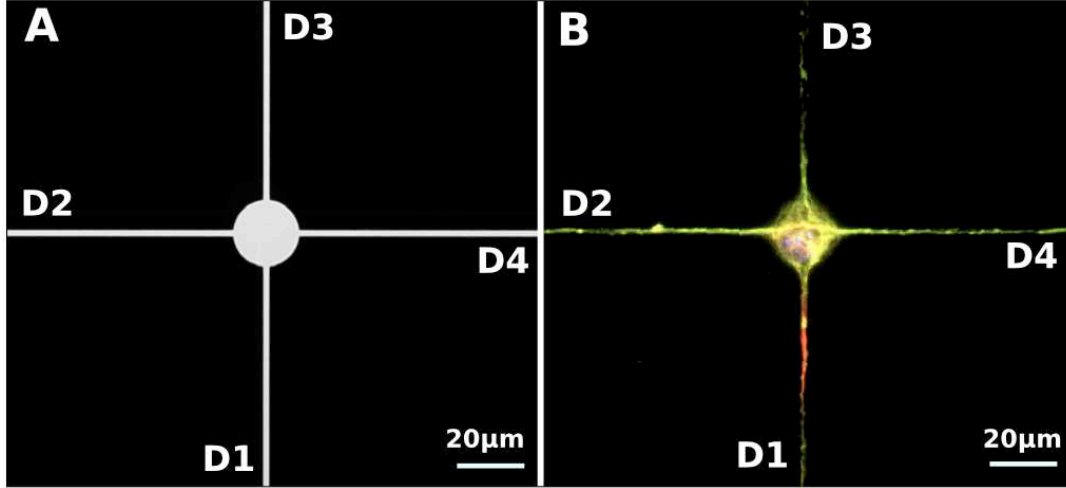


FIGURE 4.3: Neurone fixé à 6 jours de culture sur notre motif contrôlé. En vert : tubuline tyrosinée, en bleu : noyau, en rouge : ankyrin G. L'axone se trouve dans ce cas selon la direction D1.

théorique aléatoire de 25%. Pour cela, nous calculons l'écart réduit ϵ (voir section 3.3.2 page 78), qui est égal dans le cas du motif contrôlé à 1,11. Le pourcentage n'est donc pas significativement différent de l'aléatoire.

Un facteur de qualité d'efficacité dans le contrôle de la différenciation axonale a été défini. Nous le nommons facteur d'orientation. Ce facteur de qualité est un nombre compris entre 0 et 1, et défini par l'équation 4.1. Il est égal à 0 dans le cas d'un motif où la position de l'axone est aléatoire et égal à 1 dans le cas d'un motif qui positionne à 100% l'axone dans la direction désirée. Nous avons décidé d'introduire un tel facteur pour pouvoir comparer les motifs à trois directions possibles de développement qui seront présentés dans la suite de cette étude avec ceux en comprenant quatre. En effet, un pourcentage de 40% de cellules par exemple avec leur axone dans une même direction est plus important pour un motif à quatre directions, où l'aléatoire est de 25,0% que pour un motif à trois directions, où l'aléatoire est à 33,3%.

$$F.Q.O = \frac{(\% \text{cellules orientées} - \% \text{aléatoire})}{(100\% - \% \text{aléatoire})} \quad (4.1)$$

Le facteur d'orientation est égal pour notre motif contrôlé à 0,050 dans le cas le plus défavorable (28,8% d'axone orientés dans la même direction), ce qui, comme nous venons de le voir n'est pas significativement différent de zéro.

4.2 Première idée : le motif boomerang BmA

Pour ce motif original, nous nous sommes inspiré de résultats bibliographiques montrant d'une part, l'importance de la position de certains organites cellulaires lors de la différenciation axonale (cf. 1.3.1 page 31), et d'autre part, l'effet de certaines géométries de micropattern dans l'organisation interne des cellules Hela (cf. 2.1.3 page 51).

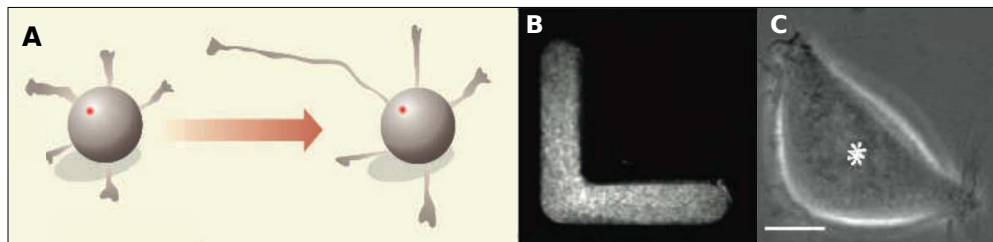


FIGURE 4.4: Positionnement du centrosome : son importance dans la différenciation axonale (A) (de Anda FC, 2005) et son contrôle dans des cellules Hela (B et C) (Théry M, 2005) A/ Le centrosome se positionne, dans les premiers stades du développement des neurones, en face du neurite qui deviendra l'axone. B/ Motif de fibronectine en forme de 'L'. C/ Cellule Hela cultivée sur le motif de fibronectine en forme de 'L' immédiatement après l'ensemencement. La position du centrosome est indiquée en astéris.

En effet, De Anda et al. ont montré chez les neurones d'hippocampes de rat que le centrosome se positionne, dans les premiers stades de développement du neurone, en face du neurite qui deviendra l'axone (Fig. 4.4/A) (de Anda FC, 2005). Si l'on arrivait à contrôler cette position du centrosome grâce à un motif original, serait-il alors possible de déterminer la position de l'axone ? Nous nous sommes donc intéressés à certaines géométries particulières de motifs, qui permettent de positionner les organites cellulaires tels que le noyau, centrosome ou appareil de Golgi de façon reproductible chez les cellules Hela. Notamment, avec un motif en forme de 'L', le centrosome se positionne sur la bissectrice de celui-ci, à mi-hauteur (Fig. 4.4/ B et C) (Théry M, 2005). Nous nous sommes donc demandé si un tel contrôle de l'organisation cellulaire et notamment de la position du centrosome par des motifs particuliers était réalisable sur neurones d'hippocampe de souris.

Un motif original, nommé BmA a donc été dessiné. Celui-ci est constitué d'un 'boomerang' (Bm) pour l'emplacement du corps cellulaire, et de trois chemins pour le développement des neurites (Fig 4.5/A). L'épaisseur des lignes de pousse neuritique mesure $2\mu\text{m}$, celle du boomerang $5\mu\text{m}$ et l'espacement entre deux motifs en réseaux mesure $150\mu\text{m}$. Ce boomerang est conçu pour que le corps cellulaire du neurone n'adhère pas sur toute sa surface, à l'image des motifs en forme

de 'L' de Théry et al.. Notre hypothèse consiste à supposer que la position du centrosome sera contrôlée de la même manière que pour une cellule Hela par un motif en forme de 'L'. L'axone devrait alors se développer dans la direction la plus proche de cette position, c'est à dire selon la direction D1 (Fig 4.5/B)

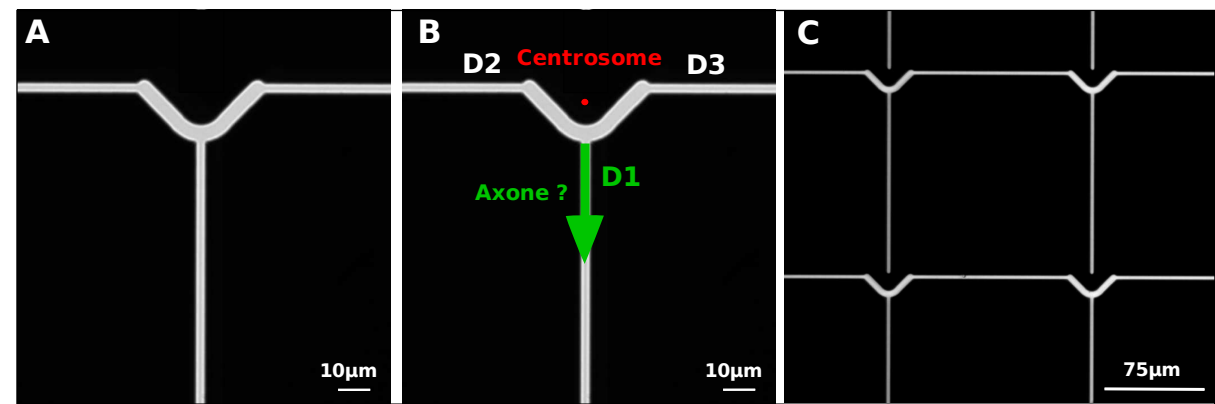


FIGURE 4.5: **Le motif BmA et son principe.** A/ Géométrie du motif BmA. Les directions D2 et D3 forment un angle on nul avec les lignes du boomerang central, d'où l'appellation BmA. B/ Principe de fonctionnement de la localisation interne du centrosome (en rouge) et de l'axone (en vert). C/ Photographie de la position centrale du masque utilisé : motif BmA en réseau.

4.2.1 Facteur d'orientation du motif

Des cultures de neurones d'hippocampes de souris ont été réalisées sur nos motifs BmA construits en réseau de huit par huit BmA (Fig 4.5/C). Comme pour notre motif contrôle, nous avons quantifié le nombre de neurones correctement placés, seuls sur un motif, marqués ankyrin G et repéré la position de leur axone (Fig 4.6). Trois cultures provenant d'embryons différents ont été réalisées. Les résultats sont exposés dans le tableau 4.2.

Nombre de Neurones	D1		D2		D3	
157	95	60,5%	32	20,4%	30	19,1%

TABLE 4.2: **Tableau récapitulatif de la position des axones de neurones à 6 jours de culture cultivés sur le motif BmA.** Le nombre de neurones comptabilisés (bien placés, seuls sur un plot et marqués ankyrin) est indiqué dans la première colonne. La valeur des pourcentages correspondant est indiquée dans les cellules grisées.

Nos résultats indiquent que 60,5% des 157 neurones comptabilisés sur 3 cultures possèdent leur axone dans la direction D1 (70% des neurones bien placés étaient marqués ankyrin G). L'intervalle

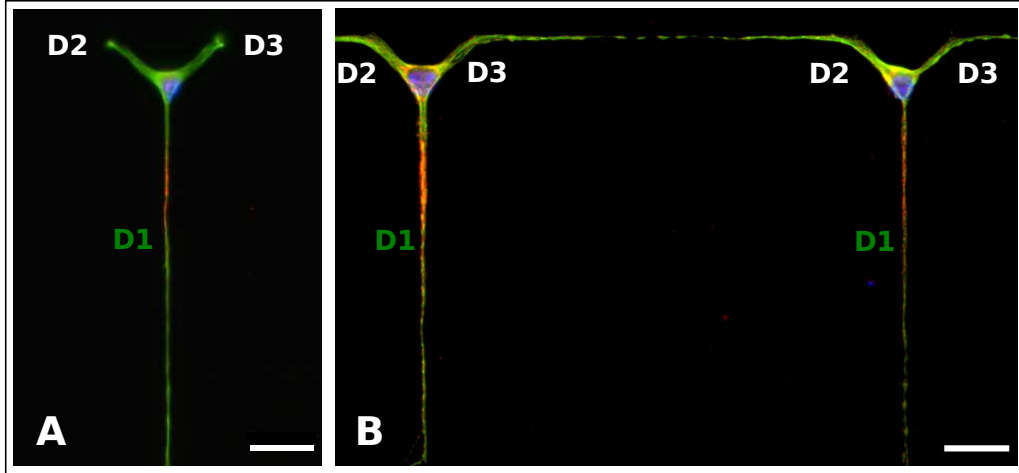


FIGURE 4.6: Marquage des cellules à 6 jours de culture avec l'ankyrin G (rouge), tubuline tyrosinée (vert) et noyau (bleu). A/ Neurone isolé ayant développé son axone dans la direction D1. B/ Deux neurones en réseaux ayant également développé leurs axones dans la direction D1. La barre d'échelle mesure $20\mu\text{m}$

de confiance à 95% place le pourcentage entre 52,9% et 68,1%. Ce pourcentage d'axones orientés dans la direction D1 est significativement différent de l'aléatoire à 33,3% ($\epsilon=7,328$, risque inférieur à 10^{-9}). Notre motif BmA influe donc sur la différenciation axonale. Le facteur de qualité d'orientation est ici égal à 0,41. Bien que cette orientation soit insuffisante pour espérer contrôler la polarité d'un réseau de quelques neurones avec un taux de réussite acceptable[†], ce résultat est extrêmement encourageant.

4.2.2 Questions ouvertes

L'observation des photos de neurones cultivés sur les motifs BmA a amené des questions sur l'origine réelle de l'influence de cette géométrie sur l'orientation de la position de l'axone. En effet, au lieu de l'unique contrainte cellulaire que nous pensions faire subir aux neurones, nous nous sommes rendus compte qu'une autre contrainte s'appliquait également sur les neurites des directions D2 et D3. Le corps cellulaire, au lieu d'occuper la totalité du triangle formé par le 'L', comme les cellules Hela de Thery et al., est généralement décentré vers la direction D1, de sorte que les neurites sur les directions D2 et D3 doivent franchir un angle lors de leur développement (Fig 4.7). Est-ce donc la contrainte cellulaire ou neuritique qui intervient dans l'influence de la géométrie du motif BmA sur l'orientation de la position de l'axone ? Les deux prochaines sections

[†]. 22% de chance d'avoir un mini réseau de 3 neurones orientés correctement.

présenteront les deux motifs contrôles Cont-Bm et Cont-A que nous avons réalisé afin de répondre à cette question.

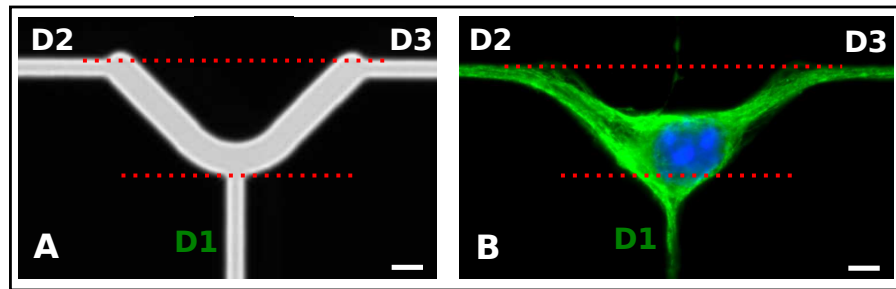


FIGURE 4.7: **Le placement des corps cellulaires est déplacé vers la direction D1 dans le motif BmA.** A/ Photo en transmission du motif BmA avec ses lignes de repère en pointillés rouges. Elles indiquent les limites hautes et basses de l'emplacement désiré du corps cellulaire. B/ Photo en fluorescence de neurone d'hippocampe de souris fixé à 6 jours de culture. (En vert, la tubuline tyrosinée et en bleu le noyau). Les lignes de repères du motif sont reportées. Le corps cellulaire n'est pas positionné entre les lignes de repères mais est déplacé vers le bas, c'est à dire dans la direction D1. La barre d'échelle correspond à $5\mu\text{m}$

4.3 Motif Cont-Bm et position du centrosome

4.3.1 La contrainte cellulaire du motif BmA : un nouveau motif Cont-Bm

Ce premier motif de contrôle Cont-Bm a été conçu afin de déterminer la contribution réelle de la contrainte cellulaire Bm du motif BmA sur l'effet d'orientation de la position de l'axone. Il reprend le même motif Bm pour l'adhésion du corps cellulaire. Plus aucun angle ne se trouve en revanche sur le trajet des neurites se développant dans les directions D2 et D3 (Fig 4.8).

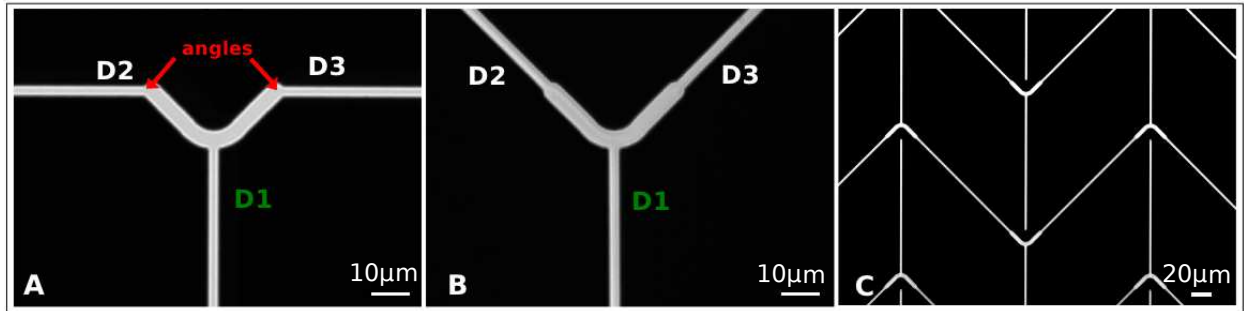


FIGURE 4.8: **Principe du motif Cont-Bm** A/ Motif BmA. B/ Motif Cont-Bm : contrôle de la contrainte cellulaire Bm du motif BmA. Seuls les angles dans les directions D2 et D3 ne sont plus présents. C/ Motif Cont-Bm en réseau.

4.3.2 Facteur d'orientation du motif Cont-Bm

Regardons la position des axones sur ce nouveau motif. La même méthode est appliquée dans la comptabilisation des neurones avec leurs axones développés selon chaque direction, sur trois cultures différentes (Fig 4.9). Les résultats sont indiqués dans le tableau 4.3. Sur 203 cellules correctement placées, seules et marquées ankyrin, 57,6% ont leur axone positionné selon la direction D1, contre 20,2% et 22,2% respectivement pour les directions D2 et D3 (61% des neurones marqués ankyrin). L'intervalle de confiance à 95% pour le pourcentage d'axone positionnés dans la direction D1 est compris entre 50,8% et 64,4% . Il est également significativement différent de l'aléatoire ($\epsilon=7,454$, risque inférieur à 10^{-9}). Bien que ce pourcentage soit plus faible que celui de BmA, la différence n'est pas significative ($\epsilon=0,5545$, risque de 0,58) (voir section 3.3.3 à la page 3.3.3). Ainsi, il semble que la contrainte cellulaire Bm soit capable, à elle seule, de positionner l'axone préférentiellement dans la direction D1. Le facteur de qualité est pour ce motif égal à 0,36.

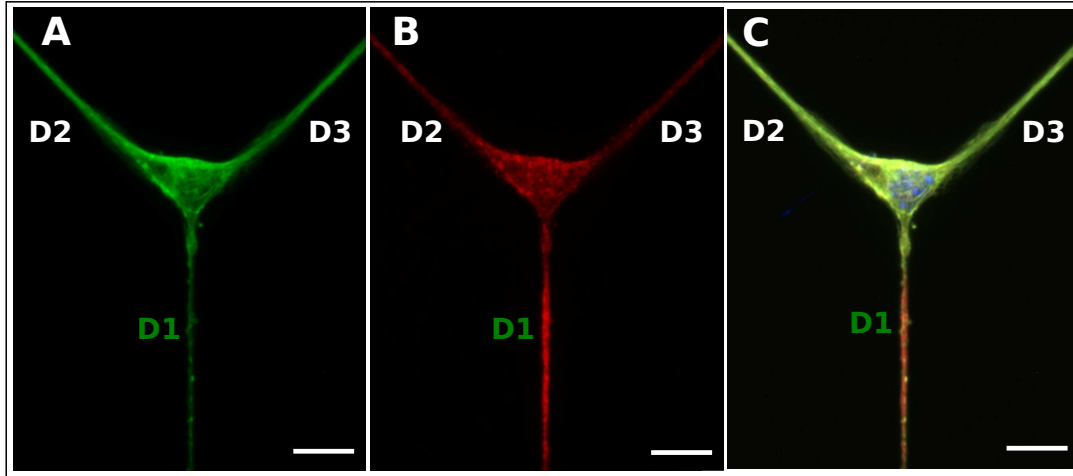


FIGURE 4.9: **Neurone fixé à 6 jours de culture sur un motif Cont-Bm.** A/ Marquage de la tubuline tyrosinée. B/ Marquage de l'ankyrin. C/ Superposition de la tubuline tyrosinée (en vert), de l'ankyrine (en rouge) et du noyau (en bleu). La barre d'échelle représente 10 μ m

Nombre de neurones	D1		D2		D3	
203	117	57,6%	41	20,2%	45	22,2%

TABLE 4.3: **Comptabilisation de la position des axones après six jours de culture sur le motif Cont-Bm.** La valeur des pourcentages correspondants est indiquée dans les cellules grisées.

4.3.3 Position du centrosome

Une différenciation axonale préférentielle ayant été observée dans les motifs BmA et Cont-Bm, il est maintenant nécessaire de vérifier notre hypothèse de départ concernant le placement du centrosome. Pour cela, des marquages γ tubuline ainsi que des transfections centrine ont été réalisés (Fig 4.10/B). La position du centrosome a ainsi été déterminée sur des neurones au 2^{ème} et 3^{ème} jour de culture. Ceux-ci ont ensuite été classés selon leur stade de développement, stade 2 ou 3 (partie 1.2.2 page 24). La position des centrosomes a été déterminée selon quatre zones d'intérêt (Fig 4.10/A), grâce à un programme *labview vision* décrit dans la partie 3.14 à la page 86. Trois de ces zones Z1, Z2 et Z3 sont présentes devant l'entrée de chacune des directions possibles pour le développement des neurites D1, D2 et D3, conformément aux résultats de De Anda et al.. Une quatrième zone Z0, centrale, nous permettra de quantifier le nombre de cellules ayant leur centrosome le long de l'axe de symétrie de Bm (Z0+Z1), conformément aux résultats de Théry et al.. Les résultats sont reportés dans le tableau 4.4 et la figure 4.11.

Grâce à un tel motif, nous arrivons à positionner le centrosome de neurones au stade 2 à plus

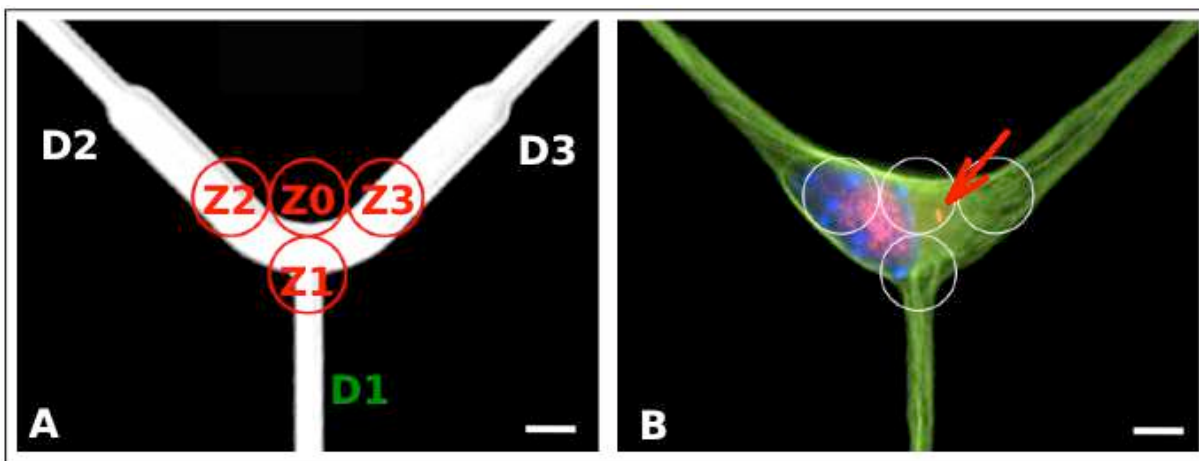


FIGURE 4.10: **Zones d'intérêt pour la position du centrosome sur le motif Cont-Bm.** A/ Photo en transmission du masque, avec les zones d'intérêt (cercles rouges, de rayon $3,5\mu\text{m}$). Quatre zones d'intérêts ont été dessinées : trois devant l'entrée de chaque neurite (Z1, Z2 et Z3) et une centrale (Z0). B/ Photo en fluorescence d'un neurone marqué : en vert la tubuline tyrosinée, en bleu le noyau et en rouge la γ tubuline. Les zones d'intérêt sont reportées en blanc. Dans ce cas, le centrosome se trouve dans la zone Z0. La barre d'échelle représente $5\mu\text{m}$.

Stade	Nombre de neurones	Z1		Z2		Z3		Z0		Autre	
Stade 2	67	30	44,8%	0	0,0%	1	1,5%	24	35,8%	12	17,9%
Stade 3	78	38	47,8%	10	12,8%	8	10,3%	8	10,3%	14	17,9%

TABLE 4.4: **Tableau récapitulatif des résultats du positionnement des centrosomes par zone sur le motif Cont-Bm, sur des neurones au stade 2 et 3.** La valeur des pourcentages correspondant est indiquée dans les cellules grisées.

de 80% dans les zones correspondant à la ligne de symétrie de notre motif, avec environ 45% dans la zone Z1. Ainsi, moins de 1,5% des neurones ont leur centrosome positionné dans les zones Z2 et Z3, situées à la base des directions D2 et D3.

Si l'on considère que cette position du centrosome au stade 2 déterminera la position de l'axone, au moins 44,8% des neurones devraient développer leur axone dans la direction D1. De fait, nous savons que le pourcentage final de neurones ayant développé leur axone dans la direction D1 est égal à 58,7%. Cette disparité pourrait s'expliquer par le mouvement de centrosomes de la zone Z0 vers la zone Z1 entre les stades 2 et 3, entraînant ainsi le développement de l'axone de ces neurones suivant la direction D1.

Intéressons nous maintenant aux neurones de stade 3. Le pourcentage de neurones avec leur centrosome dans les zones Z1, Z2 et Z3 augmente effectivement, alors que celui de la zone Z0

diminue. En effet, 71% des neurones ont maintenant leur centrosome à l'entrée d'un des neurites. Comparons maintenant ces résultats au positionnement réel des axones (Fig 4.11). Le pourcentage d'axones positionnés dans chaque direction est plus important d'environ 10% que le pourcentage des centrosomes positionnés dans les zones correspondantes Z1, Z2 et Z3 au stade 3. Il semble que les quelques 30% de centrosomes non placés dans les zones Z1 Z2 et Z3 induisent une répartition équitable du développement axonal le long des trois directions . Cela pourrait être du à la dynamique de l'organite. En effet, les cellules sont fixées à un temps précis de leur développement. La présence du centrosome ne serait-elle nécessaire à l'entrée du futur axone que pendant un temps restreint dans le développement ? Des vidéomicroscopies de cellules transfectées ont été réalisées

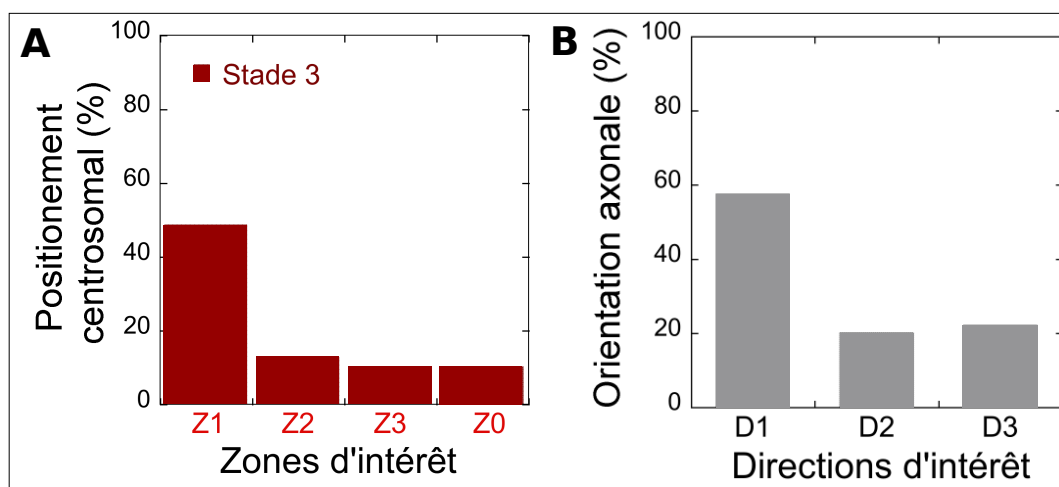


FIGURE 4.11: **Comparaison entre la position des centrosomes et l'orientation axonale** A/ Pourcentage de cellules au stade 3, ayant leur centrosome dans chaque zone. B/ Pourcentage de cellules avec leur axone dans chaque direction.

(voir matériel et méthodes, section 3.2.3 page 76), afin de visualiser le mouvement du centrosome lors du développement des neurones sur nos motifs. Ces vidéos ont été réalisées entre le stade 2 et 3 de développement sur des motifs qui seront présentés dans la suite de ce manuscrit (section 6.1.1 page 131) mais qui incluent le sous motif Bm pour l'adhésion du corps cellulaire. Le but de ces vidéos était de filmer le mouvement des deux centrioles lors d'une différenciation axonale. En résultat préliminaire, nous avons obtenu jusqu'à 15h de film, qui nous ont apporté des pistes de compréhension de la dynamique de cet organite. Sur une première vidéo, les deux centrioles que nous nommerons père (le plus intense) et fils, montrent des mouvements qui semblent indépendants (Fig 4.12) . En effet, alors que le centriole père ne bouge que très peu, le fils semble se trouver à l'entrée de chaque neurite lors de la pousse de celui-ci. Sur une seconde vidéo (Fig 4.13), le

centriole père semble arriver à l'entrée de la direction D1. Ainsi, il semble que chacun des centrioles ait un rôle dans le développement du neurone. Est-ce donc le centriole père qui initie la différenciation axonale ? Quelque soit la réponse, les deux centrioles sont très dynamiques lors du développement, ce qui concorde avec nos interprétations de déplacement important du centrosome dans les premiers stades de développement.

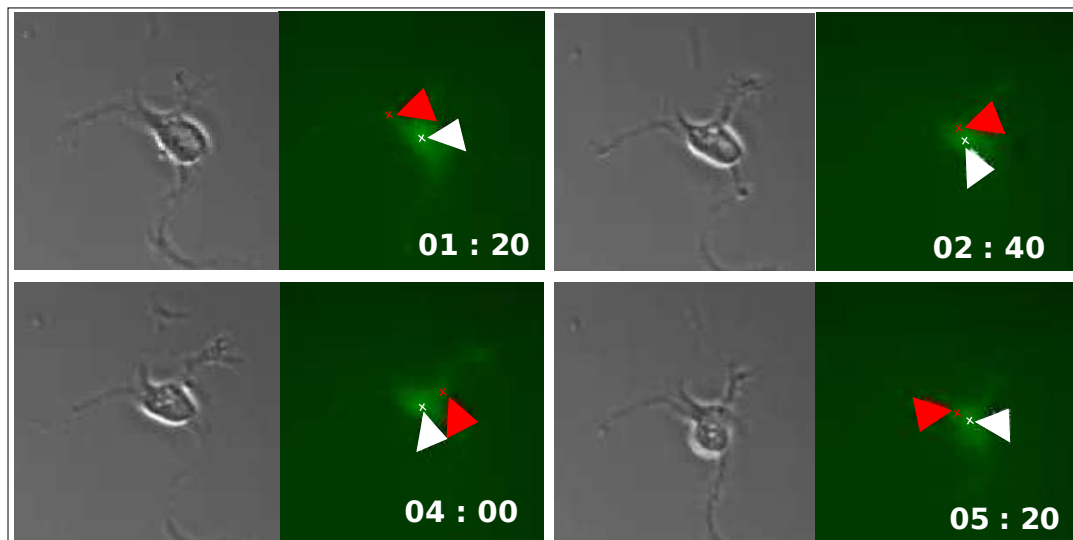


FIGURE 4.12: Le centriole fils à l'entrée de chaque neurite lors de sa pousse Le centriole père est indiqué avec une flèche blanche, le fils avec une flèche rouge.

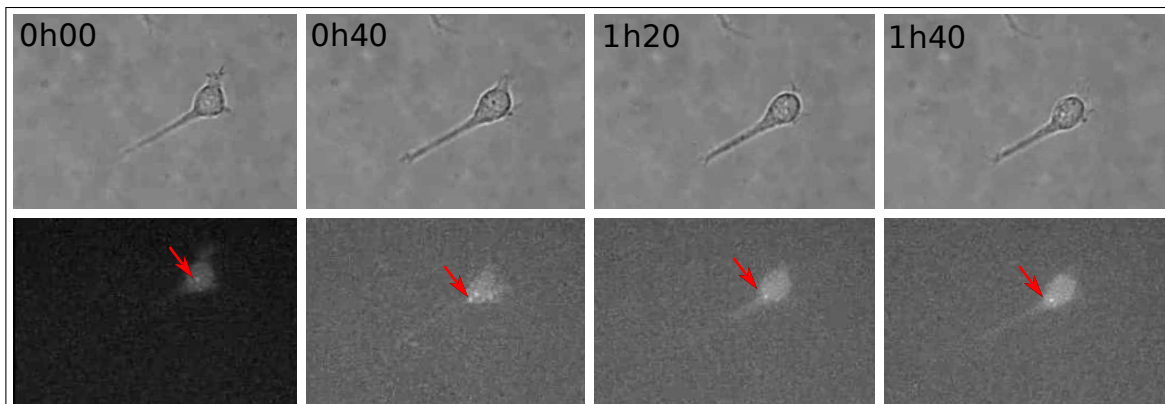


FIGURE 4.13: Mouvement du centrosome père vers l'entrée d'un des neurites lorsque celui-ci semble tirer le corps cellulaire.

4.4 Vers une contrainte géométrique des neurites

Même si le pouvoir d'orientation du motif BmA s'est finalement révélé exclusivement lié à la géométrie Bm, nous avons imaginé un autre motif contrôle Cont-A destiné à sonder l'influence de la contrainte neuritique que nous avons étudié en parallèle de Cont-Bm. Il présente l'intérêt de nous avoir amené à la notion de courbure neuritique et à l'intérêt de cette courbure dans la différenciation axonale. Les résultats de ce motif Cont-A sont exposés dans cette section.

4.4.1 La contrainte angulaire du motif BmA : un nouveau motif Cont-A

Ce second motif a pour but d'examiner l'effet des angles que deux des neurites doivent franchir lors de leur développement dans les directions D2 et D3 (Fig.4.14). Le motif est donc exactement le même que le BmA, à l'exception de l'emplacement pour le corps cellulaire, dans lequel est introduit un plot de 15 μm de diamètre.

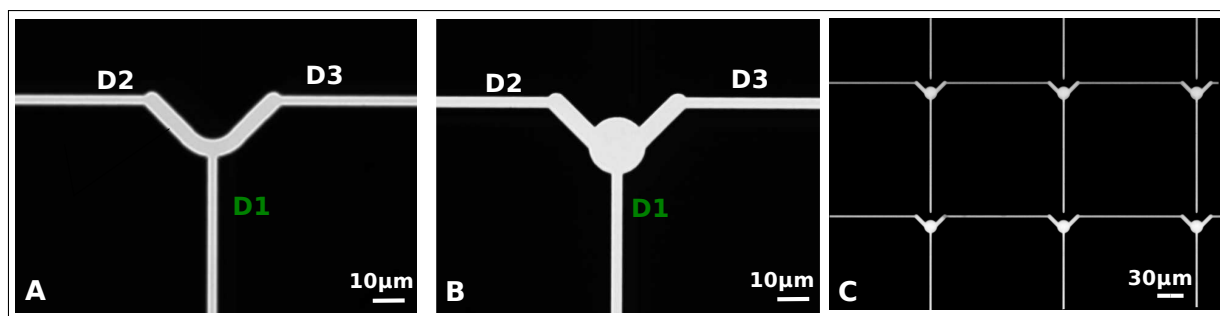


FIGURE 4.14: **Principe du motif Cont-A.** A/ Motif BmA. B/ Motif Cont-A. C/ Motif Cont-A en réseau. L'emplacement cellulaire Bm a été remplacé par un plot de diamètre 15 μm .

4.4.2 Facteur d'orientation

Examinons les résultats du positionnement de l'axone sur un tel motif. En appliquant toujours les mêmes méthodes de quantification sur trois cultures différentes (Fig.4.15), nous obtenons les résultats résumés dans le tableau 4.5. Pour ces lamelles, le pourcentage de neurones marqués ankyrin est égal à 58%. 50% des neurones environ ont développé leur axone dans la direction D1, soit un facteur de qualité d'orientation de 0,24. Avec un intervalle de confiance à 95% ce pourcentage est compris entre 44,3% et 54,9%. Il est significativement différent de l'aléatoire ($\epsilon=6,576$, risque inférieur à 10^{-9}) et du motif BmA ($\epsilon=2,2706$, risque=0,02 soit 2%). Ainsi, ce

motif favorise la pousse de l'axone dans la direction D1, mais plus faiblement que le motif BmA. Il semble donc qu'une contrainte angulaire imposée sur deux des neurites favorise la pousse de l'axone dans la troisième direction. Cependant, les corps cellulaires semblent encore soumis une contrainte géométrique puisque pour la plupart, ils conservent une forme triangulaire. Cette contrainte est différente de celle de BmA puisque la zone sous le corps cellulaire du neurone est complètement adhésive. Ainsi, avec ce motif, nous ne sommes pas complètement certains que le neurone soit soumis à l'unique contrainte angulaire des neurites. Le succès de l'orientation de l'axone dans la direction D1 avec notre motif BmA est donc dû de manière certaine à une contrainte géométrique agissant sur le corps cellulaire (Bm), et peut-être également à une contrainte angulaire sur les neurites. L'influence de contraintes angulaires sur les neurites dans la différenciation axonale reste donc à être explorée.

Nombre de Neurones	D1		D2		D3	
347	172	49,6%	86	24,8%	89	25,6%

TABLE 4.5: Tableau récapitulatif de la position des axones de neurones à 6 jours de culture cultivés sur le motif Cont-A. Le nombre de neurones comptabilisés (bien placés, seuls sur un plot et marqués ankyrin) est indiqué dans la première colonne. La valeur des pourcentages correspondant est indiquée dans les cellules grisées.

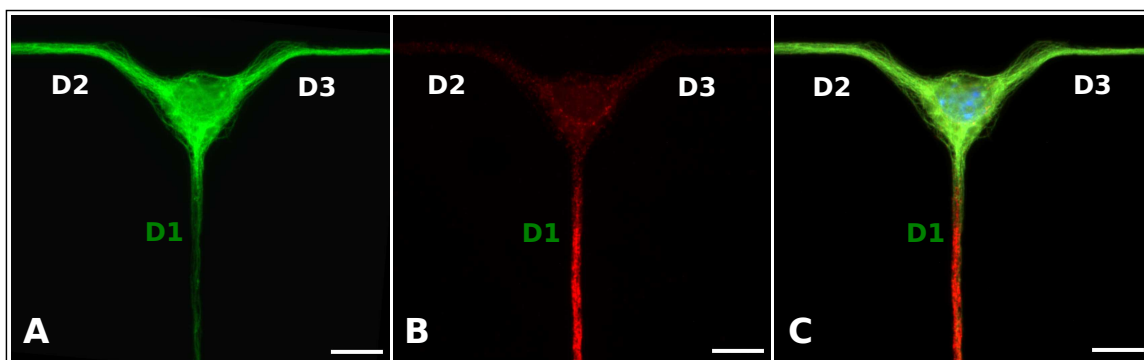


FIGURE 4.15: Neurone fixé à 6 jours de culture sur le motif Cont-A. A/ Marquage de la tubuline tyrosinée. B/ Marquage de l'ankyrin. C/ Superposition de la tubuline tyrosinée (en vert), de l'ankyrine (en rouge) et du noyau (en bleu). La barre d'échelle mesure $10\mu\text{m}$.

4.4.3 Une contrainte plus ou moins efficace

L'observation des cellules n'ayant pas présenté l'orientation attendue dans la direction D1 nous a permis de remarquer que les contraintes angulaires imposées par le motif peuvent être plus ou

moins efficaces. Effectivement, sur certains des échecs du motif Cont-A, nous avons noté que l'angle réel emprunté par l'axone était plus ouvert que celui prévu par le motif. Le neurone se positionne de telle manière que l'axone, au lieu de suivre l'angle du motif, coupe celui-ci de telle sorte que l'angle soit beaucoup plus ouvert (Fig 4.16). La courbure des axones qui se sont différenciés sur les chemins D2 et D3 semble plus faible que celle imposée par le motif. Ainsi, existe-t-il une courbure critique à partir de laquelle le neurite n'arrive plus à se différencier en axone ?

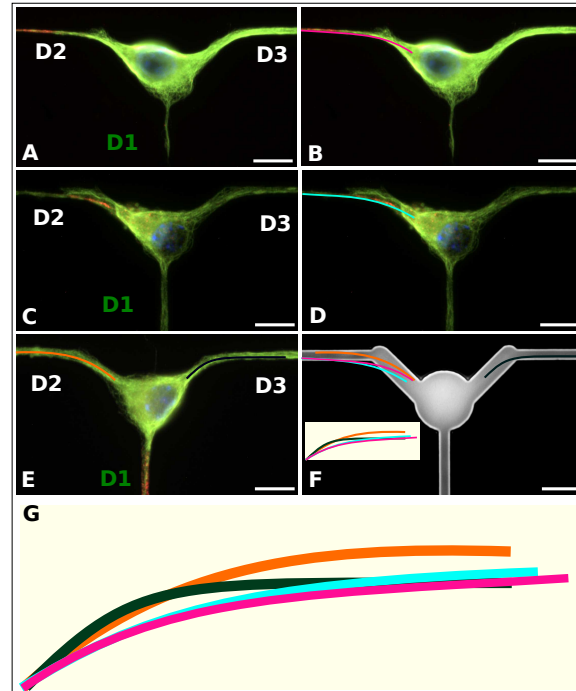


FIGURE 4.16: Une contrainte angulaire plus ou moins efficace. A/ Neurone orienté dans la direction D2 fixé à 6 jours de culture et marqué ankyrin (rouge), tubuline tyrosinée (vert) et noyau (bleu). L'allure de la courbure de l'axone est indiquée en rose dans l'image B/. C/ Neurone avec axone orienté dans la direction D2. L'allure de la courbure de l'axone est indiquée en bleu clair dans la figure D/. E/ Neurone bien orienté dans la direction D1. L'allure des deux neurites est indiquée en orange et noir. F/ Photo en transmission du motif Cont-A. Les allures des neurites des images B, D et E sont représentées en couleur sur le motif. L'échelle indiquée correspond à $10\mu\text{m}$. G/ Comparaison des allures des neurites. La courbure des axones différenciés sur les directions D2 et D3 (en bleu et rose) est inférieure à celle des dendrites des neurones différenciés dans la direction D1.

En conclusion, un premier motif nous a donné des résultats encourageants quant au contrôle de la différenciation axonale, avec un succès à plus de 60%. Il nous a permis de déterminer deux types de contraintes, une appliquée sur le corps cellulaire, et une seconde sur les neurites, par le biais des deux motifs contrôle qui en ont découlé : Cont-Bm et Cont-A. Nous avons prouvé qu'en utilisant un motif de la géométrie de Cont-Bm, nous pouvons imposer une contrainte sur le corps cellulaire du neurone qui contrôle la position du centrosome des le stade 2. Au vu de nos résultats, il semble bien qu'imposer la position du centrosome au stade 2 de développement à l'entrée d'un des neurites induise une position préférentielle de l'axone dans la direction correspondante, conformément aux résultats de Anda et al. Quant à notre motif contrôle Cont-A, bien que celui-ci ne nous satisfasse pas quant aux déductions possibles des résultats obtenus, il aura quand même eu pour avantage de nous intéresser à d'éventuelles contraintes neuritiques.

Chapitre 5

Contrainte Neuritique

Sommaire

5.1	Des motifs jouant sur le rôle de la tension dans la différen-	
	ciation axonale	109
5.1.1	L'idée de départ	109
5.1.2	Le développement d'un neurite sur une ondulation : notre modèle . . .	110
5.1.3	Présentation des différents motifs	112
5.2	Facteur d'orientation des motifs	112
5.2.1	Etude des échecs d'orientation pour les motifs $W_{1.80}$ et $W_{2.00}$	116
5.3	Les décrochements	121
5.3.1	Zoom sur les décrochements	121
5.3.2	Eviter les décrochements : une confirmation du rôle de la tension . . .	125
5.4	Tension et Position du centrosome ?	126

5.1 Des motifs jouant sur le rôle de la tension dans la différenciation axonale

Nous avons pu voir dans la section précédente notre intérêt débutant pour une contrainte neuritique. Cette section présente les motifs originaux W_α que nous avons créé afin d'explorer ce type de contrainte.

5.1.1 L'idée de départ

L'un des premiers signes de la différenciation axonale est l'élargissement de l'un des cônes de croissance des neurites, traduisant une activité plus importante de celui-ci. Ce cône de croissance génère des forces permettant au neurite de s'allonger rapidement (1.2.2, page 25). Il est admis dans la littérature qu'il génère une tension interne T dans le neurite (section 1.3.2, page 34). Ainsi, il semble que lors de la différenciation axonale, un des neurites développe via son cône de croissance une tension supérieure à celle des autres. D'autre part, Lamoureux et al. ont montré que l'application d'une tension extérieure sur un des neurites au stade 2 de développement induit sa différenciation en axone (1.3.2, page 36)((Lamoureux P, 2002)). Il semble donc que le fait d'imposer le franchissement d'un certain seuil de tension à un neurite, le force à se différencier en axone. Lors du développement du neurite en axone, celui-ci dépasse-t-il intrinsèquement un seuil de tension, crée par l'activité plus importante de son cône de croissance ?

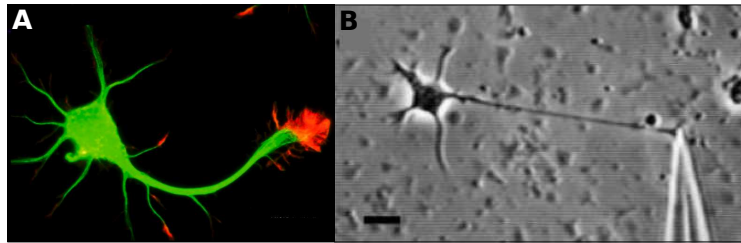


FIGURE 5.1: **Le rôle de la tension dans la différenciation axonale.** A/ Neurone d'hippocampe de souris marqué à 2 jours de culture actine en rouge et tubuline en vert (avec l'accord de Leticia Peris, GIN Equipe1). Le cône de croissance du futur axone est beaucoup plus large et actif. B/ Elongation d'un neurite induite par l'application d'une tension extérieure sur un neurone de stade 2 (1.3.2, page 36)

En se basant sur cette hypothèse nous avons choisi de dessiner des motifs 'wavy' (W_α) dont le principe de fonctionnement repose sur une limitation de la tension des neurites destinées à ne pas se différencier en axone. Ainsi, ces motifs possèdent un plot de $20\mu\text{m}$ de diamètre duquel émergent

trois chemins ondulés et un chemin en ligne droite (Fig 5.2). Sur ces chemins ondulés, la tension est limitée. Le principe de cette limitation est exposé dans la section suivante. Ainsi, nous tablons sur un développement de l'axone le long du chemin droit (direction D1), où il est possible pour un neurite de dépasser librement le seuil de tension nécessaire pour se différencier en axone.

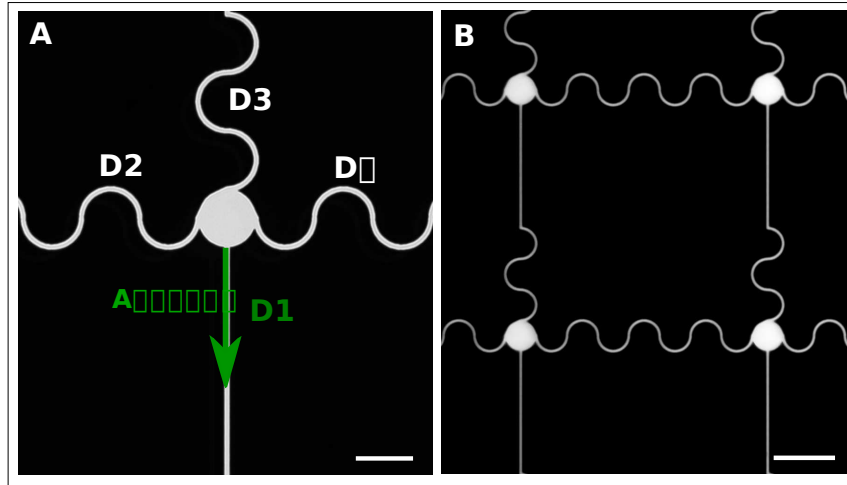


FIGURE 5.2: **Exemple de motif jouant sur les limitations de tension** A/ Photo en transmission d'un motif wavy. Les quatre directions possibles pour le développement des neurites sont indiquées. La barre d'échelle mesure $20\mu\text{m}$. B/ Photo en transmission de ce motif wavy en réseau. La barre d'échelle mesure $40\mu\text{m}$.

5.1.2 Le développement d'un neurite sur une ondulation : notre modèle

Selon un modèle très simple dans lequel la tension interne T du neurite est constante, son développement sur un chemin ondulé implique une compétition entre la force d'adhésion, qui tend à le faire suivre la trajectoire imposée par le motif, et la force induite par sa tension interne, qui tend à le faire décrocher du chemin.

Considérons en effet une petite portion dl du neurite. Celle-ci possède une tension interne T . Les forces dues à sa tension sont donc de norme T et de direction telle qu'indiqués sur la figure 5.3/A. Selon les coordonnées cylindriques (\vec{u}, \vec{v}) où \vec{u} est tangente à la courbe, les deux forces s'écrivent $-T.\vec{u}(l)$ et $T.\vec{u}(l+dl)$ (Fig 5.3/A). Pour chaque élément dl , on a donc une force élémentaire $d\vec{F}$ qui est égale à $-T\vec{u}(l)+T\vec{u}(l+dl)$. Si l'on intègre sur la demi période d'ondulation, pour l variant de 0 à L (longueur de l'ondulation), toutes les forces se compensent, excepté celles des extrémités (équation 5.1) . \vec{F} est alors égale à $-T.\vec{u}(0) + T.\vec{u}(L)$.

$$\vec{F} = \int_0^L d\vec{F} = \int_0^L (-T\vec{u}(l) + T\vec{u}(l+dl)) = T \cdot \int_0^L \frac{\vec{u}(l+dl) - \vec{u}(l)}{dl} \cdot dl = T \cdot \int_0^L \frac{d\vec{u}}{dl} \cdot dl = T \cdot (\vec{u}(L) - \vec{u}(0)) \quad (5.1)$$

Dans le cas de nos motifs, l'angle γ que forme la tangente avec la verticale est le même en $l=0$ et $l=L$. De ce fait, les composantes en \vec{x} s'annulent et les composantes verticales ont pour norme $T \cdot \cos(\gamma)$. La norme de \vec{F} est donc égale à αT avec $\alpha=2 \cdot \cos(\gamma)$ (Fig 5.3/B). Ainsi, pour une même tension interne T , plus l'angle γ est proche de zéro, plus la force résultante due à la tension interne sera grande. Cette force verticale tend à décrocher le neurite. La force d'adhésion, par contre, tend

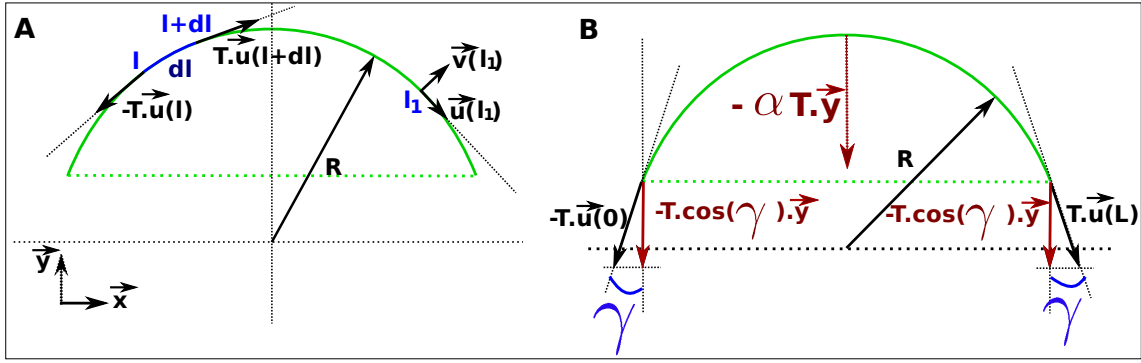


FIGURE 5.3: **Modèle de tension interne T constante du neurite et bilan des forces induites par cette tension.** A/ Bilan sur un petit élément dl (en bleu). Les coordonnées cylindriques (\vec{u}, \vec{v}) sont indiquées au point l_1 . B/ Bilan sur toute la longueur L de l'ondulation dans le cas de nos motifs symétriques. Toutes les forces se compensent, excepté celles des extrémités. La norme de la force résultante est donc égale à $\alpha \cdot T$ avec $\alpha=2 \cos(\gamma)$.

à faire adhérer le neurite sur l'ondulation. Il existe donc une compétition entre ces deux forces.

Pour un motif d'angle γ , défini dans la figure 5.3, la force due à la tension du neurite est proportionnelle à celle-ci ($F=2 \cdot T \cdot \cos \gamma$). Si T augmente, alors F également. Si cette force due à la tension interne du neurite dépasse la force d'adhésion ($F_{adhesion}$), alors le neurite décrochera du motif. Ainsi, pour un angle γ donné, le neurite peut atteindre une tension interne $T_{lim}(\gamma) = \frac{F_{adhesion}}{2 \cdot \cos \gamma} = \frac{F_{adhesion}}{\alpha}$. Pour une tension supérieure à $T_{lim}(\gamma)$, le neurite décrochera. Une fois décroché, le neurite n'a plus de points d'adhésion qu'en les extrémités de l'ondulation. Notre deuxième hypothèse de travail consiste à supposer que sans points d'adhésion, le neurite ne peut plus développer de tension. En effet, c'est via l'adhésion que la cellule relie le milieu extracellulaire au cytosquelette et peut ainsi générer des forces en réponse (voir section 1.2.1 page 23).

Prenons le cas particulier $\gamma=\pi$ (ligne droite), $T_{lim}(\pi)$ tend vers l'infini. La tension interne du neurite n'est donc pas limitée. Pour $\gamma=0$ par contre, $T_{lim}(0)=\frac{F_{adhesion}}{2}$. La tension interne du neurite ne peut pas dépasser cette valeur. Ainsi, en changeant l'angle γ du motif, il est possible de limiter plus ou moins la tension interne du neurite.

5.1.3 Présentation des différents motifs

Quatre motifs différents ont été réalisés, tous constitués d'un plot de $20\mu\text{m}$ de diamètre, duquel émergent trois prolongements ondulés et un prolongement droit (Fig 5.4/ A à D). Les ondulations des quatre motifs possèdent tous la même demi-période $L=20\mu\text{m}$ et sont construits à partir d'arcs de cercle de rayon $R=\frac{L}{2\cos\gamma}=\frac{L}{\alpha}$ et sont donc répertoriés par le sigle W_α (Fig 5.4/ F). Le détail des géométries est indiqué dans le tableau 5.1.

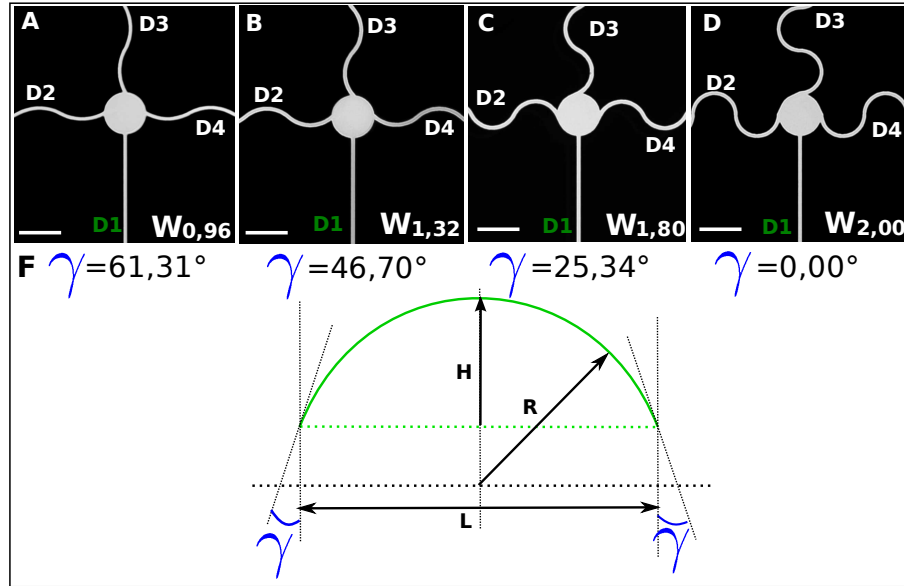


FIGURE 5.4: **Motifs 'Wavy $_\alpha$ '**. Photo en transmission des motifs $W_{0.96}$ (A), $W_{1.32}$ (B), $W_{1.80}$ (C) et $W_{2.00}$ (D). Les quatre directions sont indiquées. La barre d'échelle mesure $20\mu\text{m}$. F/ Représentation schématique d'une ondulation de motif W_α , avec ses données géométriques : R rayon de l'arc de cercle, H hauteur et l'angle γ .

5.2 Facteur d'orientation des motifs

Des cultures de neurones d'hippocampes ont été réalisées sur les différents motifs W_α (Fig 5.5). Les résultats de la comptabilisation des axones par direction est indiquée dans le tableau 5.2.

Motif W_α	Rayon : R	Courbure	Hauteur : H	γ	$\alpha = 2.\cos\gamma$	Tension limite
$W_{0.96}$	$20,83\mu\text{m}$	$48.10^{-3} \mu\text{m}^{-1}$	$1,23\mu\text{m}$	$61,31^\circ$	0,96	$\frac{F_{adhesion}}{0,96}$
$W_{1.32}$	$15,15\mu\text{m}$	$66.10^{-3} \mu\text{m}^{-1}$	$2,49\mu\text{m}$	$48,7^\circ$	1,32	$\frac{F_{adhesion}}{1,32}$
$W_{1.80}$	$11,11\mu\text{m}$	$9.10^{-2} \mu\text{m}^{-1}$	$5,64\mu\text{m}$	$25,84^\circ$	1,8	$\frac{F_{adhesion}}{1,8}$
$W_{2.00}$	$10,00\mu\text{m}$	$10^{-1} \mu\text{m}^{-1}$	$10,00\mu\text{m}$	0°	2	$\frac{F_{adhesion}}{2}$

TABLE 5.1: **Tableau récapitulatif de la géométrie des motifs W_α .** Le rayon, hauteur et l'angle γ sont indiqués dans la figure 5.4/F. La dernière colonne est la tension limite pour chaque motif que le neurite ne peut dépasser sous peine de décrocher.

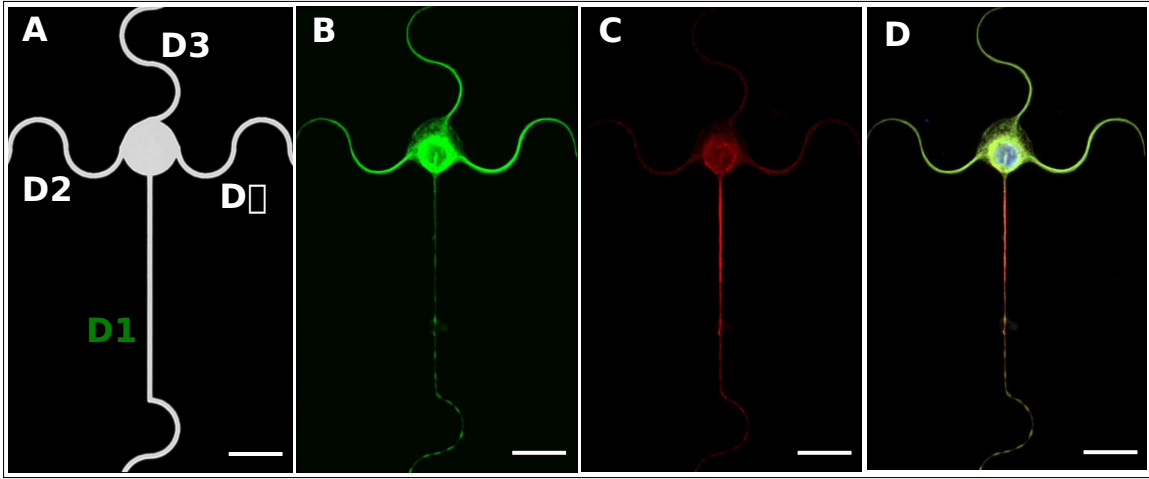


FIGURE 5.5: **Neurone fixé à 6 jours de culture cultivé sur un motif $W_{2.00}$.** A/ Photographie en transmission du masque $W_{2.00}$ avec les quatre directions. B/ Marquage de la tubuline tyrosinée. C/ Marquage de l'ankyrin G. D/ Superposition de la tubuline tyrosinée (en vert), de l'ankyrin G (en rouge) et du noyau (en bleu). L'axone s'est développé dans la direction D1. La barre d'échelle mesure $20\mu\text{m}$ pour toutes les photos.

Motif W_α	Nombre de Neurones	D1		D2		D3		D4	
$W_{0.96}$	412	104	25,2%	105	25,5%	101	24,5%	102	24,8%
$W_{1.32}$	289	83	28,7%	67	23,2%	79	27,3%	60	20,8%
$W_{1.80}$	641	286	44,6%	133	20,7%	107	16,7%	115	17,9%
$W_{2.00}$	279	183	65,6%	29	10,4%	19	6,8%	48	17,2%

TABLE 5.2: **Tableau récapitulatif de la position des axones de neurones à 6 jours de culture cultivés sur les motifs W_α .** Le nombre de neurones comptabilisés (bien placés, seuls sur un plot et marqués ankyrin) est indiqué dans la seconde colonne. La valeur des pourcentages correspondant, pour chaque direction est indiquée dans les cellules grisées.

Plus le coefficient α des motifs wavy augmente, c'est à dire plus la tension limite à partir de laquelle le neurite décroche est faible, plus le pourcentage d'axones orientés dans la direction D1

est importante. Il semble donc qu'une limitation de la tension maximale du neurite, de plus en plus importante sur les directions D2, D3 et D4, favorise la pousse de l'axone dans la direction D1 (Fig 5.6).

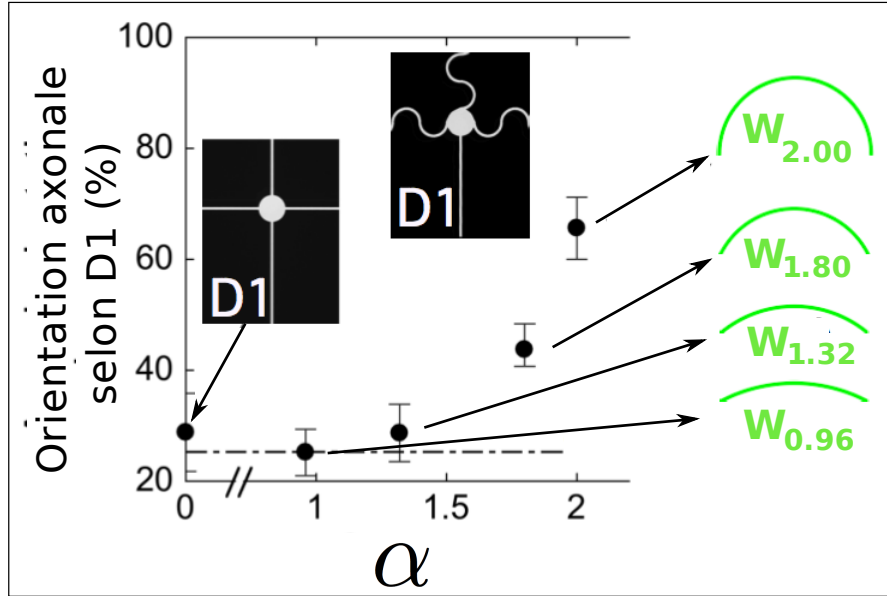


FIGURE 5.6: Pourcentage d'orientation des axones dans la direction D1 en fonction du coefficient de décrochement $\alpha = \frac{F_{adhesion}}{T}$. Les motifs W_α correspondants sont dessinés sur la droite du graphique. Le motif contrôle correspondant à un coefficient α nul est également reporté sur le graphique. Le pourcentage d'orientation aléatoire (25%) est représenté par la ligne pointillée. Pour chaque point, l'intervalle de confiance à 95% est représenté.

Statistiquement, les pourcentages de neurones des motifs $W_{0.96}$ et $W_{1.32}$ ne sont pas significativement différents de l'aléatoire 25% ($\epsilon=0,094$ et $1,453$ respectivement). Ainsi, limiter la tension interne du neurite à $\frac{F_{adhesion}}{1,32}$ ne gêne pas sa différenciation en axone.

Pour les motifs $W_{1.80}$ et $W_{2.00}$, les pourcentages sont non seulement significativement différents de l'aléatoire ($\epsilon=11,46$ et $15,58$ respectivement, d'où un risque inférieur à 10^{-9}) mais aussi statistiquement différent l'un de l'autre ($\epsilon=5,83$, risque environ égal à 10^{-8}). Ainsi, le fait de forcer la tension du neurite à être inférieure à $\frac{F_{adhesion}}{1,8}$ ou $\frac{F_{adhesion}}{2}$ gêne d'autant plus sa différenciation en axone. Se pose alors la question de savoir comment certains neurites sont arrivés tout de même à se différencier en axone dans les directions D2, D3 et D4. Le seuil de tension qu'un neurite doit franchir pour se différencier en axone peut-il varier suivant les neurones? Ainsi, imaginons qu'il n'existe pas une unique tension seuil pour tous les neurones mais une répartition autour d'une valeur moyenne $T_{seuilmoy}$ (Fig 5.7). Alors, en diminuant la tension limite, on évite à de plus en

plus de neurones de pouvoir dépasser leur tension seuil et ainsi se différencier en axone. Cette hypothèse cadrerait avec nos résultats expérimentaux (les explications sont fournies dans la légende de la figure 5.7). Une autre hypothèse, alternative et éventuellement complémentaire, consiste à

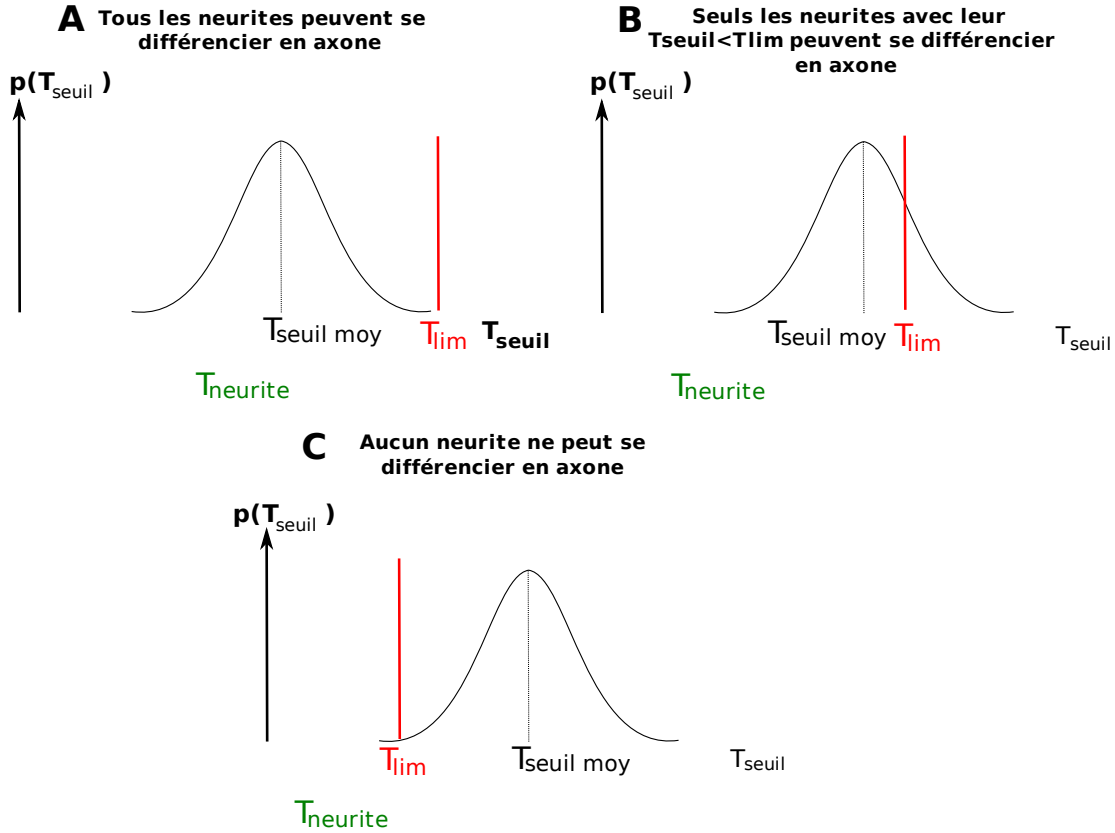


FIGURE 5.7: **Hypothèse d'une distribution (ici gaussienne par exemple) de T_{seuil} .** A/ Cas où la tension limite imposée par un motif est supérieure à toutes les tensions seuils existantes des neurones. La tension T du neurite (ici $T_{neurite}$ en vert) pouvant varier entre 0 et T_{lim} , qui est supérieure à toutes les tensions seuils, tous les neurites des neurones peuvent se différencier en axone sur les ondulations. Cela correspond à nos cas expérimentaux $W_{0.96}$ et $W_{1.32}$. B/ Cas où la tension limite imposée par le motif est comprise entre $T_{seuil\ min}$ et $T_{seuil\ max}$. Les neurites dont le neurone possède $T_{seuil} < T_{lim}$ peuvent se différencier en axone sur les ondulations, alors que les autres ne peuvent pas. Nous serions ici dans les cas expérimentaux $W_{1.80}$ et $W_{2.00}$. C/ Cas où la tension limite est inférieure à toutes les tensions seuils existantes. Aucun neurite ne peut alors se différencier en axone sur les ondulations.

se demander si les neurones se sont arrangés pour arriver à se soustraire à la limitation de tension imposée par le motif. Ceci a été vérifié et sera abordé dans la section suivante.

5.2.1 Etude des échecs d'orientation pour les motifs $W_{1.80}$ et $W_{2.00}$

Comme nous venons de le voir, bien que les neurites se différencient préférentiellement en axone dans la direction D1, certains y sont arrivés également dans les directions D2, D3 et D4. En observant ces échecs, nous nous sommes rendu compte que souvent, la forme réelle empruntée par l'axone sur la première ondulation est moins courbée que celle du motif, de sorte que la limitation de tension par le motif est moins effective (Fig 5.8). Souvent, cela est dû d'une part au fait que l'épaisseur du motif est supérieure à celle du diamètre du neurite de sorte que celui-ci peut adopter une courbure plus faible que celle prévue par le motif et d'autre part au fait que le corps cellulaire se décentre vers l'entrée de l'une des directions.

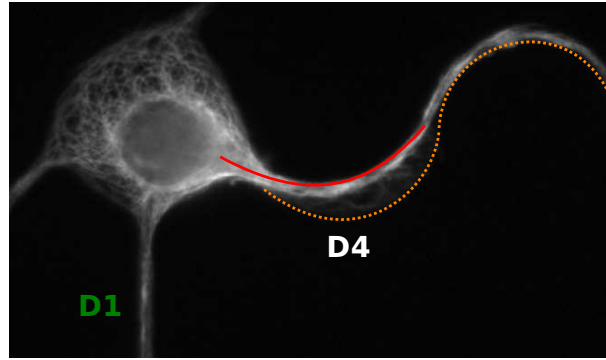


FIGURE 5.8: **Les neurites ne suivent pas forcément fidèlement le motif.** La forme réelle du neurite est indiquée en rouge. La trace du motif en pointillés oranges.

Afin de quantifier si ces neurones se sont adaptés pour arriver à dépasser la limitation de tension imposée par le motif, nous avons voulu calculer la tension limite réelle à laquelle chaque neurite, axone ou dendrite, est soumise. Pour cela, un programme matlab a été créé (voir 3.4.2 page 81). Celui-ci permet de détecter la forme réelle du neurite sur sa première ondulation puis de calculer le coefficient $\alpha = \frac{F_{adhesion}}{T_{lim}}$. α est égal, dans ces cas expérimentaux où l'ondulation n'est plus exactement un arc de cercle symétrique à $\cos\gamma_2 + \cos\gamma_1$ (voir figure 5.9). Le programme calcule donc les deux angles γ_1 et γ_2 de la première ondulation puis en déduit le coefficient α .

Une sous population de neurones représentative des motifs $W_{1.80}$ et $W_{2.00}$ a été étudiée. Dans cette sous population, le coefficient α de tous les neurites, dendrites ou axones, qui se sont développés sur des ondulations a été calculé. Les résultats sont indiqués dans le tableau 5.3.

Pour les deux motifs, les coefficients α réels sont plus faibles que le motif théorique. Cela se comprend aisément du fait de l'épaisseur du motif qui permet au neurite de plus ou moins couper

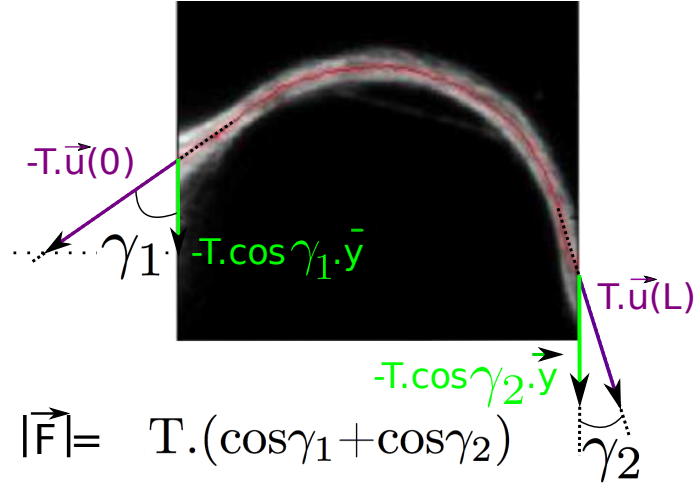


FIGURE 5.9: **Détermination de $\alpha = \frac{F_{adhesion}}{T_{lim}}$ dans les cas expérimentaux.** Photographie de la première ondulation d'un neurite. Détection de la forme du neurite par le programme matlab. Celle-ci est affichée en rouge. Les deux forces non compensées au début et à la fin de l'ondulation sont indiquées, ainsi que leurs angles avec la verticale γ_1 et γ_2 . La norme de F est alors égale, comme indiqué, à $T.(\cos\gamma_1 + \cos\gamma_2)$, d'où $\alpha = \cos\gamma_1 + \cos\gamma_2$

Motif W_α	Coefficient α	Nombre de Neurites	Dendrites	Axones	% d'Axones
$W_{1.80}$	$\alpha < 0,5$	41	29	12	29,3%
	$0,5 < \alpha < 1$	103	75	28	27,2%
	$1 < \alpha < 1,5$	108	91	17	15,7%
$W_{2.00}$	$\alpha < 0,5$	15	6	9	60,0%
	$0,5 < \alpha < 1$	14	9	5	35,7%
	$1 < \alpha < 1,5$	58	51	8	13,6%
	$1,5 < \alpha < 2$	104	95	9	8,7%

TABLE 5.3: **Nombre de neurites développées sur une ondulation avec pour coefficients de décrochement α un nombre compris entre les valeurs indiquées dans la colonne 2, pour les motifs $W_{2.00}$ et $W_{1.80}$.** Parmi ces neurites, le nombre de dendrites ou d'axones est indiqué dans les colonnes 3 et 4. La dernière colonne indique le pourcentage d'axone.

l'angle imposé. Afin de quantifier le coefficient α réel qu'impose le motif, nous l'avons calculé théoriquement. La figure 5.10 illustre le cas où le neurite présente le plus petit α . La géométrie nous donne l'équation 5.2 d'après les symboles définis dans la figure 5.10.

$$l.\cos(\gamma) + H = R_{int}.\sin(\gamma) \text{ avec } l = \sqrt{R^2 - R_{int}^2} \quad (5.2)$$

Le motif impose donc un α compris entre 1,8 et 2 pour $W_{2.00}$ et pour $W_{1.80}$ compris entre 1,17 et 1,8. Le motif $W_{2.00}$ est donc beaucoup plus sélectif, ce que nous retrouvons dans nos résultats sur

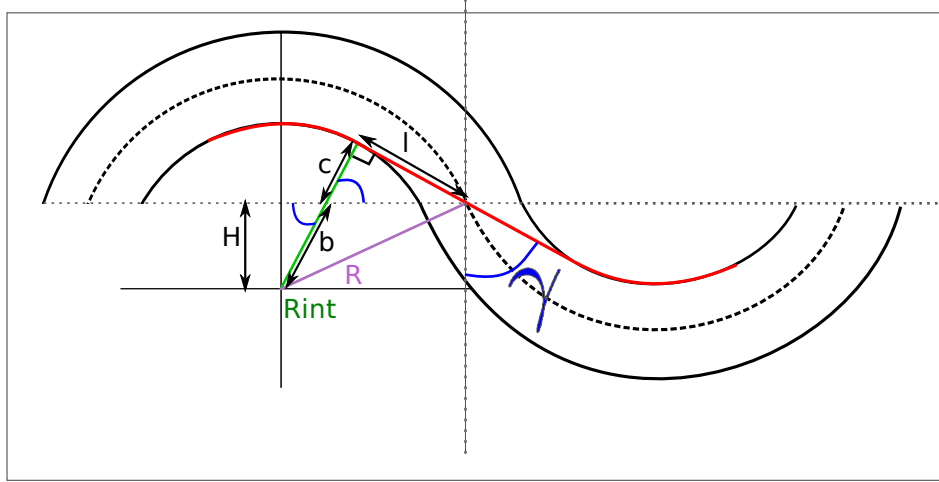


FIGURE 5.10: Du fait de l'épaisseur du motif, le coefficient α imposé par le motif peut être plus faible que le coefficient α théorique. Schéma d'un motif avec une épaisseur non nulle (L'épaisseur du motif est exagérée pour la compréhension). En rouge est dessiné l'allure que peut emprunter le neurite. Son angle γ est plus important d'où un α plus faible.

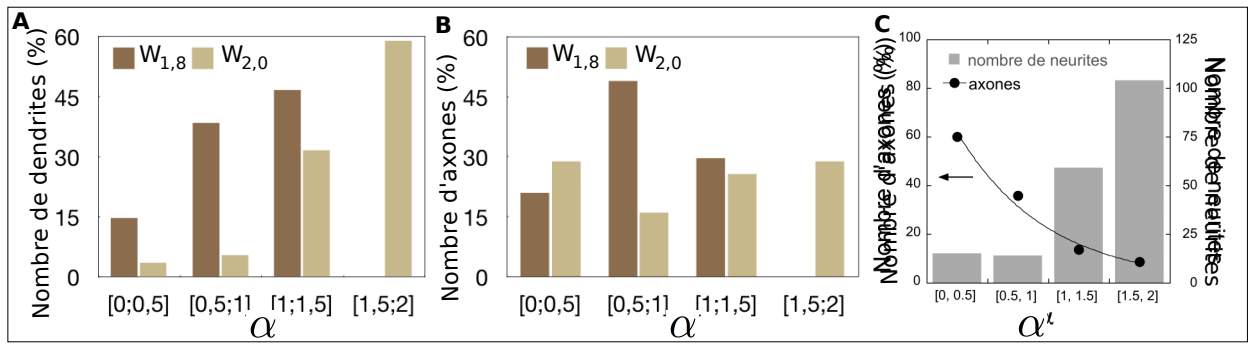


FIGURE 5.11: Répartition des coefficients α expérimentaux des neurites. A/ Nombre de dendrites ayant leur α dans les catégories indiquées pour les motifs $W_{2.00}$ et $W_{1.80}$. B/ Nombre d'axones ayant leur α dans les catégories indiquées pour les motifs $W_{2.00}$ et $W_{1.80}$. C/ Nombre de neurites ayant leur α compris dans les catégories indiquées sur l'axe des abscisses (à droite). Pourcentage d'axones parmi ces neurites (à gauche).

la répartition des coefficients α des dendrites illustrés dans la figure 5.11/A.

Pour les deux motifs, le pourcentage de neurites de nature axonale s'étant développés sur une ondulation diminue lorsque α augmente (Fig 5.11/A). Ainsi, il semble que les axones qui sont arrivés à se développer sur les ondulations ne suivent en fait pas fidèlement le motif imposé. On pourrait alors en déduire que les neurites qui sont arrivés à se différencier en axone sur des ondulations ne suivent pas fidèlement le motif, de sorte que la tension limite réellement imposée est supérieure à celle théorique du motif. Les neurites peuvent donc avoir une tension intrinsèque

supérieure à celle que l'on supposait, leur permettant alors de dépasser la tension seuil. Ceci semble vraisemblable pour des α compris entre 0,5 et 1,5, où l'on remarque sur les photos (Fig 5.12/B et C) que le neurite est certes moins courbé qu'un neurite qui suit le motif (Fig 5.12/A), mais encore clairement adhérent sur toute sa surface. Souvent, pour α compris entre 0,5 et 1,5, une sorte de grand lamellipode permet au neurite d'être encore accroché au motif (Fig 5.12/B et C). Nous parlerons dans ce cas de décrochement adhérent. Pour certains cas de faibles α par contre,

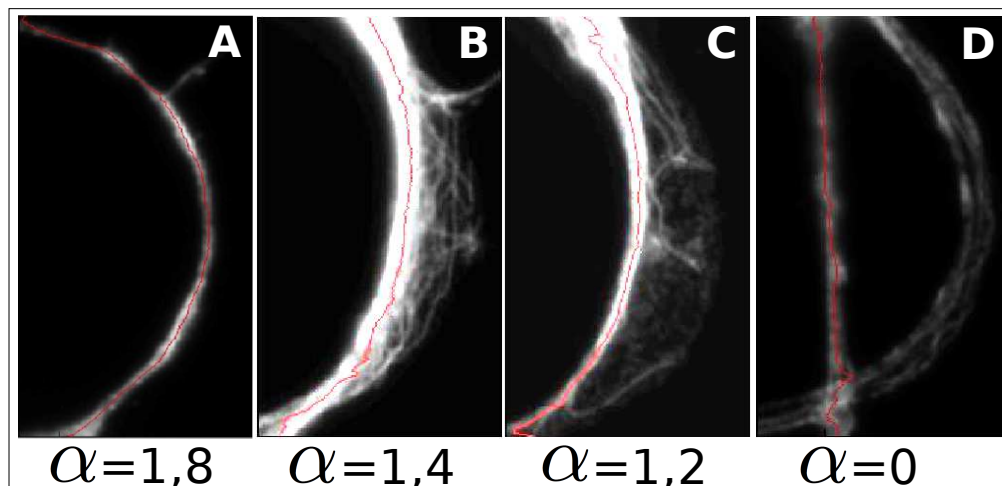


FIGURE 5.12: **Coefficients α expérimentaux des neurites.** Les quatre figures sont des photos des résultats du programme matlab. On peut distinguer en rouge l'allure des neurites que celui-ci a déterminé. A/ Neurite avec $\alpha=1,8$. Le neurite suit assez fidèlement le motif $W_{2,00}$ B/ Neurite avec $\alpha=1,4$. Le neurite est moins courbé que le motif. Sa tension interne semble plus élevée. Le neurite est élargi au niveau de l'ondulation. Il semble qu'une structure lui permette encore d'adhérer au motif. B/ Neurite avec $\alpha=1,2$. Neurite beaucoup moins courbé que le motif. Sa tension interne semble bien supérieure aux neurites des figures A et B. Une sorte de lamellipode lui permet encore d'adhérer sur le motif. D/ Neurite avec $\alpha=0$. Le neurite est complètement décroché du motif. Il semble suspendu au dessus de la zone hydrophobe. On distingue encore de la tubuline le long du motif. Le neurite est-il scindé en deux ou y-a-t-il deux neurites ?

le neurite semble complètement décroché (Fig 5.12/D). Dans ces cas, nous ne pouvons donc plus affirmer, si l'on garde toujours notre hypothèse selon laquelle l'adhésion est nécessaire pour pouvoir générer une tension, que le neurite est devenu un axone sur l'ondulation car il a pu développer une tension plus importante. Notons donc que nous définissons deux types de décrochements : les décrochements adhérents pour lesquels le neurite ne suit plus le motif mais est toujours accroché à celui-ci par une sorte de lamellipode et les décrochements complets pour lesquels le neurite est comme suspendu au dessus de la zone hydrophobe, sans point d'adhésion.

Comparons maintenant séparément la population des dendrites et celle des axones développées sur les ondulations, et la répartition de leurs α correspondants. Commençons par les dendrites

(Fig 5.11/B). Nous pouvons remarquer que pour les deux motifs, $W_{1.80}$ et $W_{2.00}$, les dendrites se trouvent de manière plus fréquente avec un α dans la catégorie la plus haute du motif, respectivement entre 1 et 1,5 pour $W_{1.80}$ et entre 1,5 et 2 pour $W_{2.00}$. Ainsi, il semble que les dendrites soient plus stables dans une position suivant correctement le motif. Regardons maintenant la population des axones développés sur les ondulations, et la répartition de leur α correspondants (Fig 5.11/C), il semble que les axones soient plus stables dans le motif $W_{1.80}$ que pour $W_{2.00}$. En effet, les axones développés sur les ondulations du $W_{2.00}$ ne montrent pas une préférence pour une certaine valeur de α . Ils sont au contraire bien répartis dans les différentes catégories, comme s'il on avait figé les différentes étapes de leurs décrochages et raccrochages. Pour le motif $W_{1.80}$, par contre, les axones ont une préférence pour une valeur de α comprise entre 0,5 et 1.

Finalement, les résultats de cette étude semblent concorder avec nos hypothèses de départ. En effet, lorsque les neurites sont arrivés à se différencier en axone, elle ont en fait un α plus faible que celui imposé par le motif et ont ainsi pu développer une tension interne plus importante. Cependant, comment se fait-il que certains de ces axones soient complètement décrochés ? Il semble que le comportement des neurites sur les ondulations soient plus complexes que notre simple hypothèse supposant que du moment qu'un neurite décroche, ne pouvant plus augmenter sa tension interne, il ne peut plus devenir un axone. Ce que l'on peut noter par contre, c'est que les axones développés sur les ondulations sont de moins en moins stables lorsque l'on augmente la limitation de tension. Notons également que cette étude à été réalisée uniquement sur la première ondulation des neurites. La forme empruntée par les neurites sur cette première ondulation apparaît donc cruciale.

5.3 Les décrochements

5.3.1 Zoom sur les décrochements

Afin d'essayer de mieux comprendre les décrochements et leur dynamique, des vidéomicroscopies ont été réalisées. Bien que les motifs utilisés, $BmW_{2.00}$, seront exposés dans la section 6.1.1 à la page 131, ceux-ci comportent les mêmes ondulations que $W_{2.00}$. Ces vidéos ont été réalisées dès deux heures après l'ensemencement.

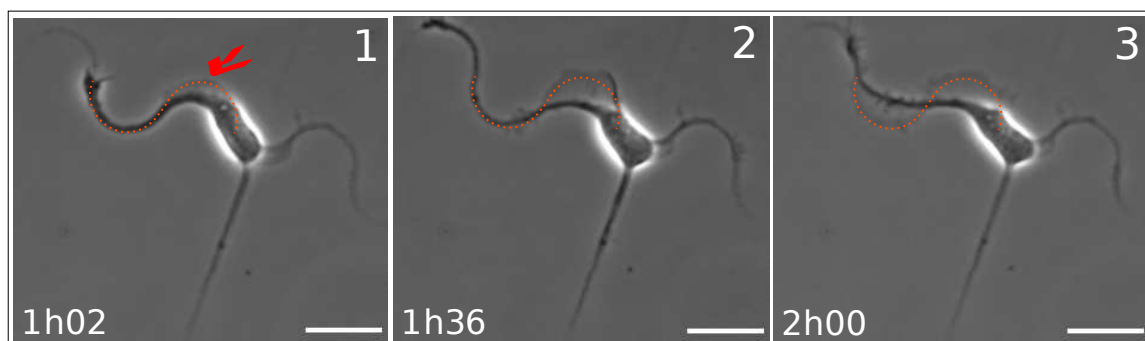


FIGURE 5.13: **Décrochement adhérent.** Au cours du temps, le neurite indiqué par une flèche rouge semble augmenter sa tension interne puisque celui-ci tend à devenir droit (vignette 3). Cependant, un grand lamellipode lui permet d'adhérer au motif (le motif est indiqué en pointillés oranges). Le temps écoulé est indiqué en bas à gauche. La barre d'échelle représente $20\mu m$.

Comme nous l'avons vu dans la section précédente pour le cas des décrochements adhérents, il semble que les neurites puissent augmenter nettement leur tension interne tout en restant accroché au motif en développant un lamellipode. Ce phénomène a été visualisé sur la vidéomicroscopie de la figure 5.13. Cependant si elles se tendent trop, elles peuvent parfois complètement décrocher du motif, ce que nous avons appelé décrochement complet dans la section précédente. Un exemple est donné dans la vidéomicroscopie de la figure 5.14, vignettes 1 à 8. Le neurite est alors comme suspendu au dessus de la zone hydrophobe (Fig 5.14, vignette 5 et Fig 5.15, vignette 5). Ce seuil de tension avant décrochage complet semble très variable d'un neurone à l'autre. Les neurones des vidéos des figures 5.13 et 5.14 (vignettes 1 à 3) semblent beaucoup plus tendus tout en restant adhérent que celui de la vidéo 5.15 par exemple qui décroche complètement très rapidement (vignettes 1 à 4). Cependant, il est tout de même possible, une fois décrochées que les neurites se raccrochent (Fig 5.14, vignettes 6 à 8 et Fig 5.15, vignettes 5 à 7). Cela semble faire intervenir soit des filopodes, soit des lamellipodes, soit une vague arrivant du corps cellulaire (voir section 1.11 page 28). Comme les neurites sont courts et que le phénomène se déroule près du corps

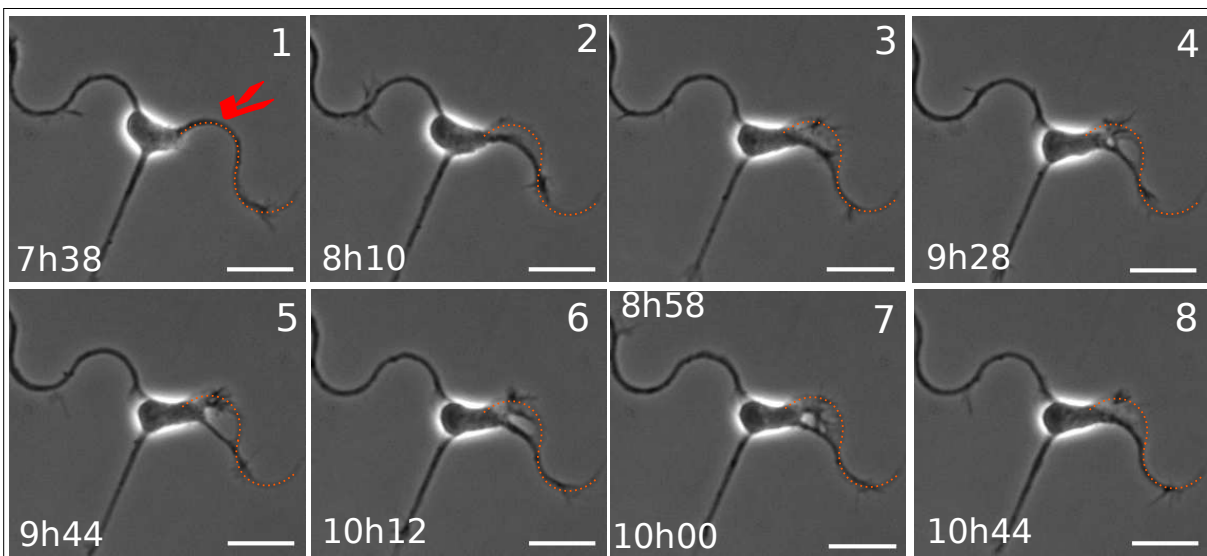


FIGURE 5.14: **Décrochement adhérent d'un neurite suivi d'un décrochement partiel puis d'un raccrochement.** De la vignette 1 à 3, la tension interne du neurite indiqué par une flèche semble augmenter. Celui-ci reste tout de même accroché au motif sur toute sa surface par un grand lamellipode. A partir de la vignette 4 jusqu'à 6, le neurite est comme suspendu au dessus de la zone hydrophobe, sans points d'adhésion. Sur la vignette 8, le neurite est raccroché par un grand lamellipode. Le temps écoulé est indiqué en bas à gauche. La barre d'échelle représente $20\mu\text{m}$

cellulaire, il est difficile de le déterminer. Ces même vagues semblent augmenter la tension locale du neurite lors de leur passage (Fig 5.16 et Fig 5.17). Dans le cas de la figure 5.17, le neurite décroche complètement après ce passage.

Si les différentes structures observées en parallèle des décrochements sont des vagues, lamellipodes et filopodes, ils doivent être riches en actine. Des marquages de l'actine ont donc été réalisés sur cellules à 3 jours de cultures (Fig 5.18).

Notons que nous retrouvons, comme attendu, de l'actine au niveau des cônes de croissance. Des décrochements adhérents ainsi que complets sont visualisés. Pour le cas des décrochements adhérents, le neurite est accroché au motif grâce à une structure remplie d'actine, ce qui concorderait avec notre hypothèse d'un lamellipode (Fig 5.18 flèches bleues). Bien que ce phénomène ne soit pas visualisé sur les vidéomicroscopies que nous avons présentées, les décrochages complets laissent parfois une sorte de neurite qui suit le motif, de sorte qu'il est difficile de déterminer si c'est un même neurite qui s'est dédoublé ou si, à la base, se trouvaient deux neurites côte à côte. Nous pouvons effectivement voir dans le cas de la figure 5.18/D que sur la première ondulation du prolongement le plus long, qu'il est difficile de déterminer si deux neurites sont présents sur le

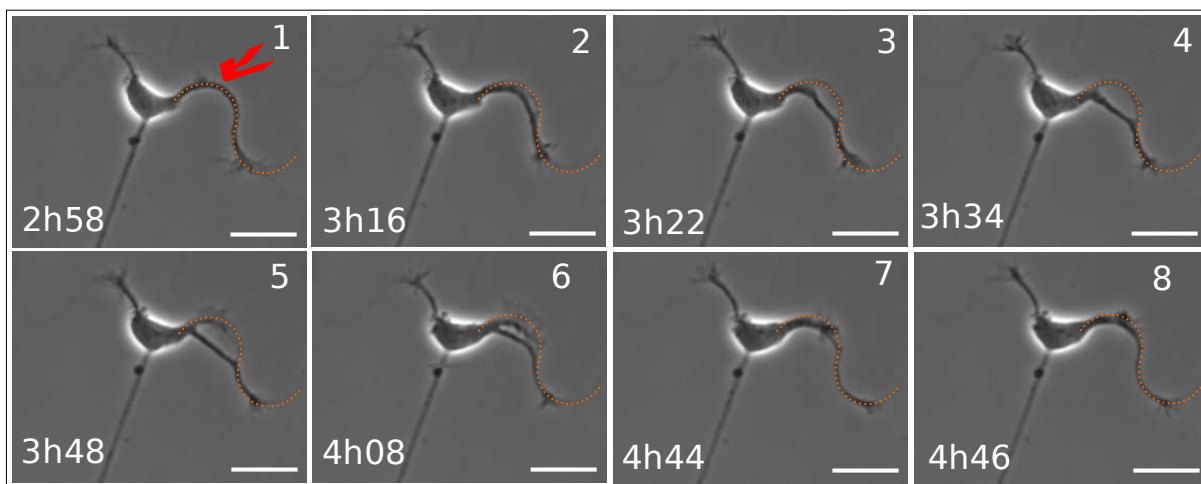


FIGURE 5.15: **Décrochage complet puis raccrochage d'un neurite** Vignettes 1 à 3 : le neurite indiqué par une flèche semble augmenter sa tension interne. Vignettes 4 et 5 : le neurite est complètement décroché. Vignette 6 à 12 : Raccrochement peut-être du à une de vague venue du corps cellulaire. Le temps écoulé est indiqué en bas à gauche. La barre d'échelle représente $20\mu\text{m}$

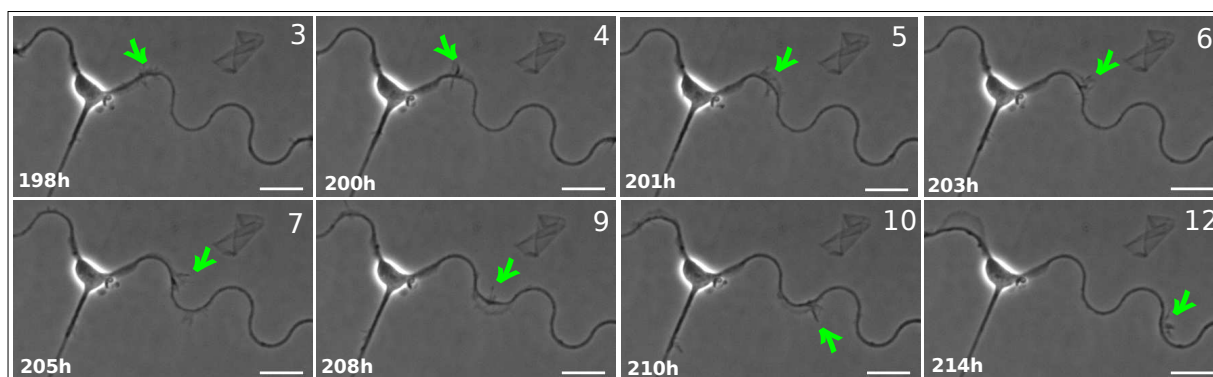


FIGURE 5.16: **Le passage d'une 'vague' induit un décrochement adhérent du neurite.** La vague est indiquée par une flèche verte. Après son passage, le neurite semble augmenter sa tension locale car il décroche du motif, tout en restant adhérent (vignettes 5 et 9). Le temps écoulé est indiqué en bas à gauche. La barre d'échelle représente $20\mu\text{m}$

même chemin. Aucune structure d'actine ne retient ce neurite au motif. Cependant, on retrouve de l'actine tout au long du neurite décroché. Cette actine va-t-elle servir pour un raccrochement éventuel? Sur d'autres photos de la figure 5.18, plusieurs cas de décrochements complets sont visualisés. Dans le cas de la figure A par exemple, l'actine suit le motif, alors que les microtubules le coupent complètement. Dans le cas de la figure C, une vague se trouve sur l'ondulation où se déroule un décrochement complet (indiqué par une flèche rouge). Elle semble garder avec elle une partie des microtubules. Ainsi, le passage d'une vague semble pouvoir séparer un neurite en deux.

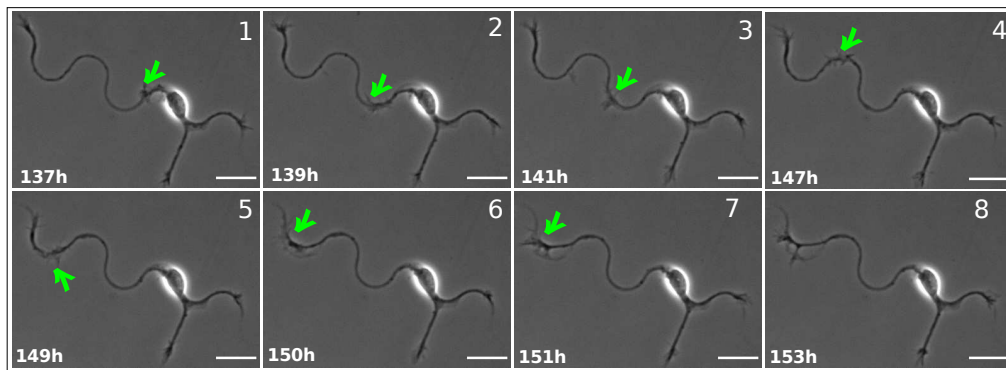


FIGURE 5.17: **Le passage d'une 'vague' peut induire un décrochement complet du neurite.** Après le passage d'une vague (indiquée par une flèche verte), le neurite semble décroché complètement du motif (vignettes 7 et 8). Le temps écoulé est indiqué en bas à gauche. La barre d'échelle représente $20\mu\text{m}$

Notons également que dans le cas de la figure D, que le corps cellulaire semble être tiré par le prolongement le plus long. De l'actine se trouve au niveau du corps cellulaire à l'opposé de l'entrée de cette direction, comme si celui-ci était retenu.

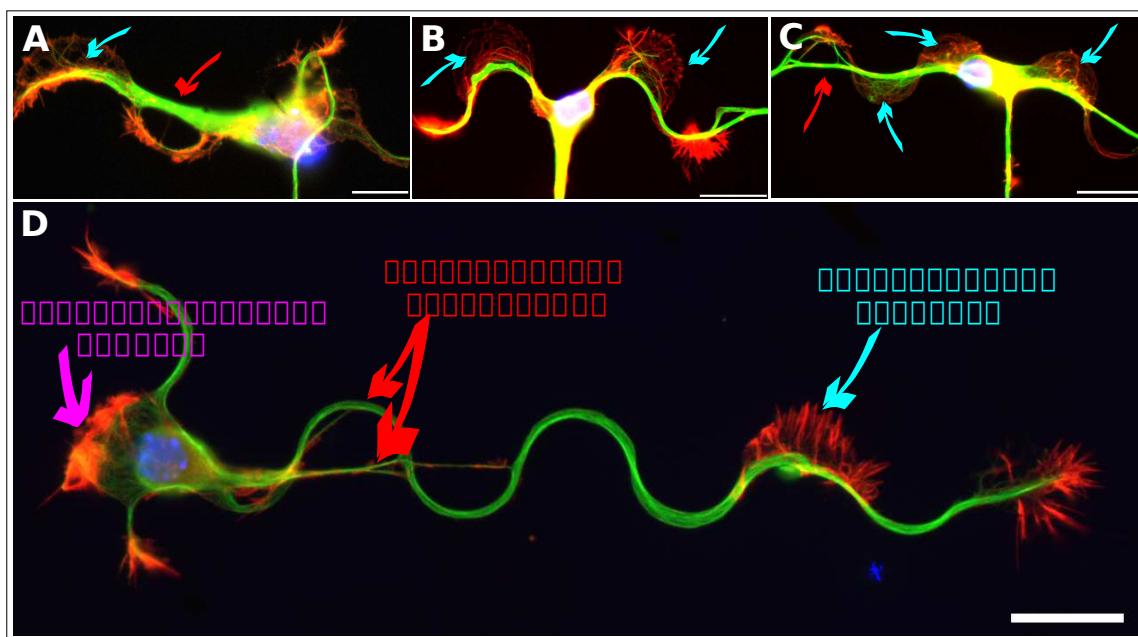


FIGURE 5.18: **Le rôle de l'actine dans les deux types de décrochements. Marquage de l'actine en rouge, de la tubuline en vert et du noyau en bleu.** Les décrochements adhérents sont indiqués avec des flèches bleues, les décrochements complets avec des flèches rouges. A/ Neurone cultivé sur le motif $W_{2.00}$. Sur la première ondulation, le neurite est complètement décroché lors que l'actine suit le motif. Sur la deuxième ondulation, le neurite est décroché mais encore adhérent. La barre d'échelle représente $10\mu\text{m}$. B/à D/ Neurones cultivés respectivement sur les motifs W_C , $BmW_{2.00}$ et $W_{2.00}$. La barre d'échelle représente $20\mu\text{m}$

5.3.2 Eviter les décrochements : une confirmation du rôle de la tension

Nous avons créé le même motif $W_{2,00}$ en tranchées. Ainsi, le neurite pourra augmenter sa tension et dépasser la tension limite imposée par le motif $W_{2,00}$ sans décrocher puisqu'un 'muret' de hauteur comprise entre 2 et 3 μm le retiendra (Fig 5.19). Cette étude a été réalisée sur silicium dans le cadre de la thèse de Ghislain Bugnicourt. Les mêmes quantifications d'orientation axonale ont été réalisées sur ces tranchées. Notons que, du fait de la technologie de gravure utilisée pour créer les tranchées, l'épaisseur des lignes du motif est supérieure aux 2 μm de nos précédents motifs $W_{2,00}$ sur verre. Le neurite peut donc naturellement se placer de manière moins courbée que le motif. L'épaisseur des tranchées mesurant 3,2 μm , nous pouvons déduire, grâce à l'équation 5.2 que le coefficient alpha imposé par le motif est compris entre 1,68 et 2. Il devrait donc toujours y avoir une forte orientation préférentielle dans la direction D1. Les résultats sont exposés dans le tableau 5.4.

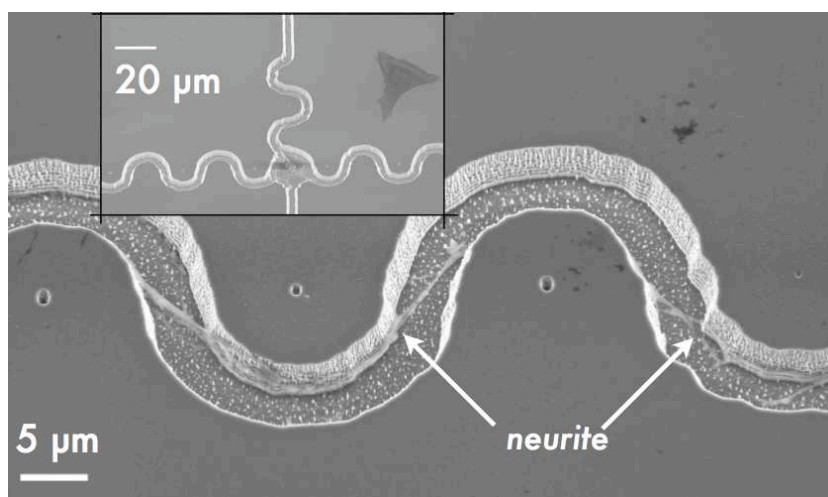


FIGURE 5.19: **Motif $W_{2,00}$ en tranchées.** Les tranchées sont réalisées par gravure au plasma SF_6O_2 du silicium avant dépôt de la poly-L-lysine.

Motif	Nombre de Neurones	D1		D2		D3		D4	
$W_{2,00}$	279	183	65,6%	29	10,4%	19	6,8%	48	17,2%
Tranchées	134	44	32,84%	28	20,90%	32	23,88%	30	22,39%

TABLE 5.4: **Tableau récapitulatif de la position des axones de neurones à 6 jours de culture cultivés sur les patterns $W_{2,00}$ et $W_{2,00}$ en tranchées** Le nombre de neurones comptabilisés (bien placés, seuls sur un plot et marqués ankyrin) est indiqué dans la seconde colonne. La valeur des pourcentages correspondant, pour chaque direction est indiquée dans les cellules grisées.

Les résultats indiquent que le pourcentage de neurones avec leur axone dans la direction D1 diminue drastiquement avec la présence des tranchées. Il passe en effet de plus de 60% à 33% (différence significative $\epsilon=6,2$, $\text{risque}<10^{-9}$). Il reste tout de même une légère orientation dans la direction D1 différente significativement à 5% de l'aléatoire ($\epsilon=2,1$), qui pourrait être au fait que certains neurites ont réussi à décrocher en franchissant l'obstacle de la tranchée. Ainsi, lorsque l'on supprime toute limitation de tension en conservant une géométrie courbe de croissance, la différenciation axonale n'est plus inhibée. Cette étude est primordiale pour montrer le rôle de la tension dans notre succès d'orientation. Ces résultats permettent de lever l'objection éventuelle que ce ne serait pas vraiment la limitation de tension qui jouerait un rôle dans notre succès d'orientation mais plutôt le fait d'un ralentissement de la vitesse de pousse lors du développement des neurites sur les chemins ondulés par rapport au chemin droit*.

5.4 Tension et Position du centrosome ?

Notre succès d'orientation à plus de 65% de la position de l'axone dans la direction D1 implique que nous avons modifié les prédispositions de certains neurones à développer leur axone vers les directions ondulées pour qu'ils le développent dans la direction D1. En effet, considérons que c'est uniquement la position du centrosome qui détermine la position de l'axone. Lorsque les neurones adhèrent sur l'emplacement pour le corps cellulaire, la position du centrosome devrait être répartie aléatoirement vers chacune des directions. 25% des axones devraient donc se développer sur la direction D1. Avec notre motif $W_{2,00}$, nous obtenons 65% d'axones dans la direction D1. 40% des neurones supposés avoir leur centrosome vers les autres directions ont donc développé leur axone dans la direction D1. Deux hypothèses s'affrontent alors. La première consiste à penser que la position du centrosome à l'entrée d'un des neurites n'est pas vraiment nécessaire pour qu'il se différencie en axone. Une seconde hypothèse implique que 40% des neurones ont déplacé leur centrosome de l'entrée des directions ondulées vers la direction D1, afin de pouvoir se différencier en axone.

Des marquages de la position du centrosome ont donc été réalisés sur nos motifs $W_{2,00}$ pour répondre à ces questions (Fig 5.20/B). De même que pour le motif Cont-Bm, des zones Z1, Z2, Z3 et Z4 ont été définies à l'entrée de chaque neurite ainsi qu'une zone centrale Z0 (Fig 5.20/A). Les résultats de ces expériences sont indiqués dans le tableau 5.5.

*. Lors de la différenciation axonale, un des neurites va croître plus rapidement, se différenciant ainsi en axone.

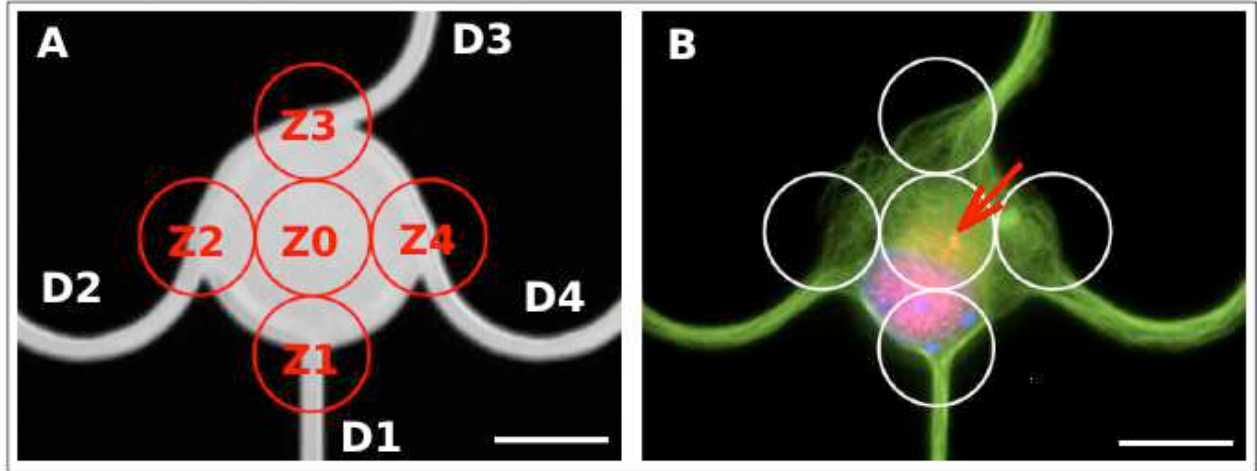


FIGURE 5.20: **Position du centrosome sur le motif $W_{2.00}$.** A/ Photo en transmission du motif avec les zones d'intérêt dessinées en rouge. B/ Photo en fluorescence d'un neurone d'hippocampe de souris marqué tubuline tyrosinée en vert, γ tubuline en rouge et noyau en bleu. Le centrosome, indiqué par la flèche, se trouve dans ce cas dans la zone Z0. La barre d'échelle représente $5\mu\text{m}$.

Stade	Neurones	Z 1		Z 2		Z 3		Z4		Z0	
Stade 2	73	2	2,74%	3	4,11%	1	1,37%	4	5,48%	58	79,45%
Stade 3	122	21	17,21%	5	4,10%	3	2,46%	3	2,46%	71	58,20%

TABLE 5.5: **Positionnement du centrosome pour le motif $W_{2.00}$ au stade 2 et 3 .** La valeur des pourcentages correspondants, pour chaque direction est indiquée dans les cellules grisées.

Au stade 2, quasiment 80% des centrosomes se trouvent dans la zone centrale Z0. Aucune préférence pour une des quatre zones Z1, Z2, Z3 ou Z4 n'est détectable. Ainsi au stade 2, la position du centrosome ne détermine pas une direction préférentielle de pousse de l'axone. Au stade 3, seul le pourcentage de la zone Z1 augmente, alors que celui de la zone Z0 diminue. Il semble donc que les neurones avec leur centrosome dans la zone Z0 au stade 2, aient un mouvement vers la zone Z1 au stade 3. Ce n'est qu'au stade 3 qu'apparaît une préférence de position du centrosome dans la zone Z1 en cohérence avec une pousse de l'axone préférentielle dans la direction D1. D'une part, il semble donc que le centrosome à l'entrée de la direction D1 soit nécessaire pour la différenciation axonale, puisque l'on détecte une orientation préférentielle vers la direction D1, alors qu'il n'y en avait pas au stade 2. D'autre part, peut-on relier la limitation de tension dans les directions D2, D3 et D4 avec une incapacité à ramener le centrosome vers l'entrée des neurites entre les stades 2 et 3? Serait-il possible que le centrosome soit tiré grâce au dépassement du seuil de tension à l'entrée du neurite afin de lui permettre de se différencier en axone?

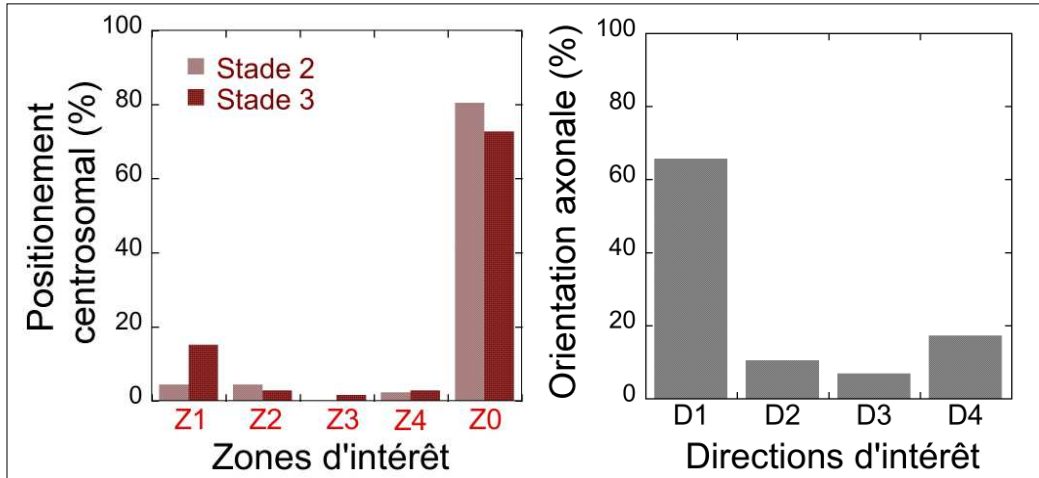


FIGURE 5.21: Position du centrosome sur le motif $W_{2.00}$.

En conclusion, notre hypothèse selon laquelle le franchissement d'une tension seuil est nécessaire pour qu'un neurite se différencie en axone semble vraisemblable. Même si le modèle de tension constante du neurite que nous avons utilisé reste très simpliste, il semble tout de même que celui-ci puisse décrire les comportements observés des neurites. Grâce à nos motif wavy, nous sommes arrivés à imposer la position de l'axone dans la direction D1 à plus de 66%. Au vu de nos résultats sur la position du centrosome, il semble qu'une relation existe entre une incapacité à ramener le centrosome à l'entrée d'un neurite et la limitation de la tension interne de celui-ci.

Chapitre 6

Le contrôle de la différenciation axonale

Sommaire

6.1	Un motif alliant contrainte neuritique et cellulaire	131
6.1.1	Présentation du motif	131
6.1.2	Facteur d'orientation	132
6.1.3	Position du centrosome	133
6.2	Amélioration du motif	136
6.2.1	Motif Soleil	136
6.2.2	Motif $\text{Bm}_{gap}W_{2.00}$	139
6.2.3	Facteur d'orientation	140
6.2.4	Position du centrosome	141

6.1 Un motif alliant contrainte neuritique et cellulaire

6.1.1 Présentation du motif

Afin d'améliorer notre pourcentage d'axones orientés dans la direction D1, nous avons créé un motif alliant la contrainte cellulaire Bm avec la meilleure contrainte neuritique trouvée (celle de $W_{2.00}$). Bm étant plus grand que le corps cellulaire, seule une partie de celui-ci a été retenue afin de mieux placer celui-ci. Le principe du motif ainsi que le masque retenu sont exposés dans la figure 6.1.

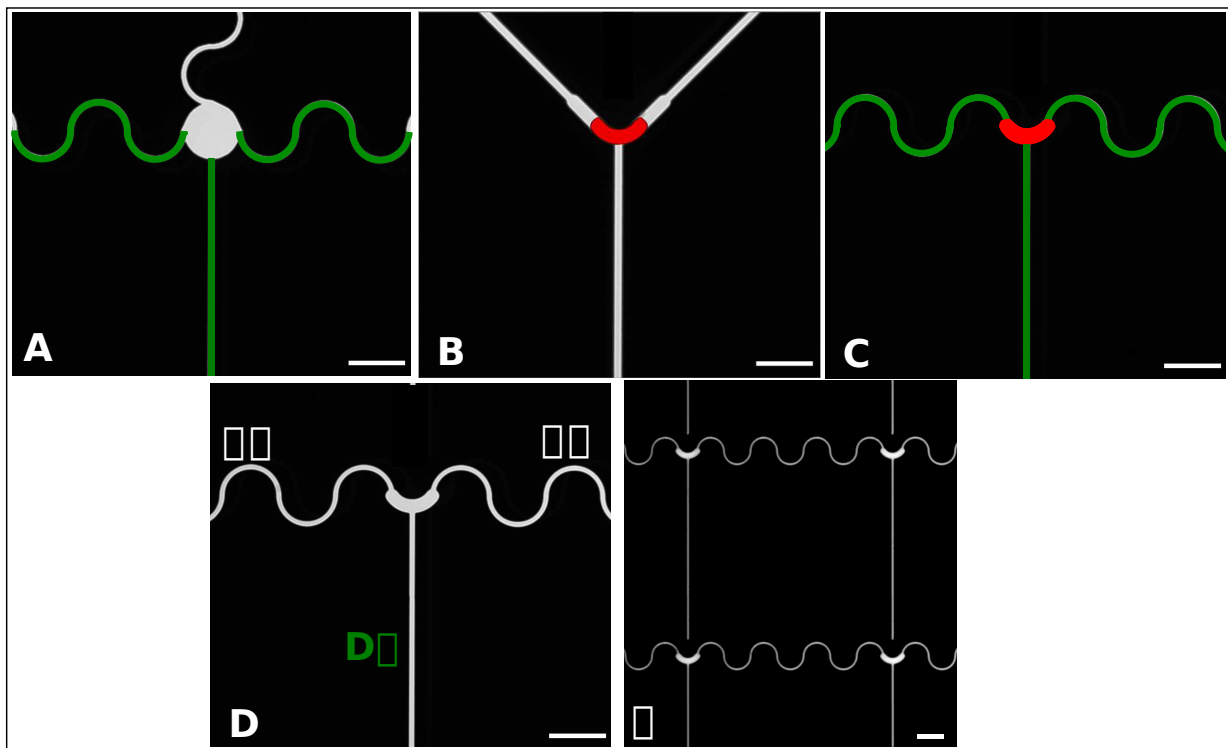


FIGURE 6.1: **Motif BmW_{2.00}**. A/ Motif $W_{2.00}$: les parties utilisées pour notre nouveau motif $BmW_{2.00}$ sont colorées en vert. B/ Motif Cont-Bm : la partie utilisée pour notre nouveau motif $BmW_{2.00}$ est colorée en rouge. C/ Principe du motif $BmW_{2.00}$ reprenant les parties vertes de $W_{2.00}$ et rouge de Cont-Bm. D/ Motif $BmW_{2.00}$. Les trois directions pour le développement des neurites sont indiquées. La direction D1 est celle supposée pour le développement de l'axone. E/ Photo d'une partie du masque du motif $BmW_{2.00}$ en réseau. La barre d'échelle mesure $20\mu m$

6.1.2 Facteur d'orientation

Le même type de quantification de la position des axones a été réalisé sur ce nouveau motif (Fig 6.2). Les résultats sont indiqués dans le tableau 6.1. 87,9% des cellules ont leur axone dans la

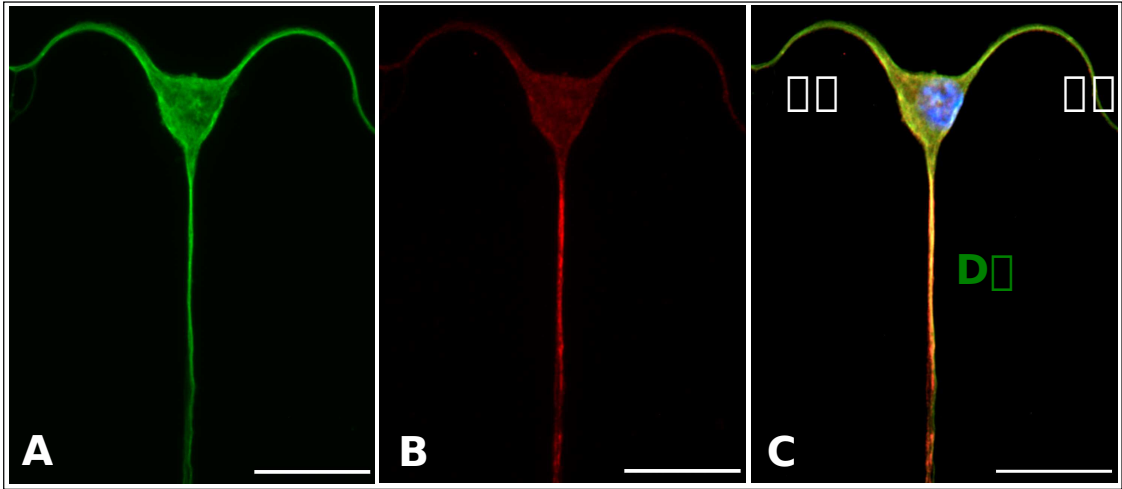


FIGURE 6.2: Neurone à 6 jours de culture fixé sur le motif $BmW_{2.00}$. A/ Marquage la tubuline tyrosinée. B/ Marquage de l'ankyrin G. C. Superposition de la tubuline tyrosinée (en vert), de l'ankyrin G (en rouge) et du noyau (en bleu). La barre d'échelle mesure $20\mu m$

direction D1. Ce résultat est bien évidemment significativement différent de l'aléatoire ($\epsilon=11,6$, risque inférieur à 10^{-9}), mais également des motifs $W_{2.00}$ ($\epsilon=4,22$, risque $<10^{-5}$) et Cont-Bm ($\epsilon=5,3$, risque $=10^{-8}$). Ainsi, il semble que les deux contraintes jouent un rôle complémentaire dans le succès d'orientation de ce motif. C'est la première fois dans la littérature que l'on arrive à orienter l'axone grâce uniquement à des contraintes géométriques avec un tel pourcentage de réussite.

Nombre de Neurones	D1		D2		D3	
99	87	87,9%	8	8,1%	4	4,0%

TABLE 6.1: Tableau récapitulatif de la position des axones de neurones à 6 jours de culture cultivés sur le motif $BmW_{2.00}$. Le nombre de neurones comptabilisés (bien placés, seuls sur un plot et marqués ankyrin) est indiqué dans la première colonne. La valeur des pourcentages correspondant est indiquée dans les cellules grisées.

6.1.3 Position du centrosome

Nous avons tenu à vérifier la position du centrosome aux stade 2 et 3 de développement des neurones sur ce motif. Les mêmes zones d'intérêt que le motif Cont-Bm, de $3,5\mu\text{m}$ de rayon, ont été définies (Fig 6.3). Les résultats des comptages sont indiqués dans le tableau 6.2.

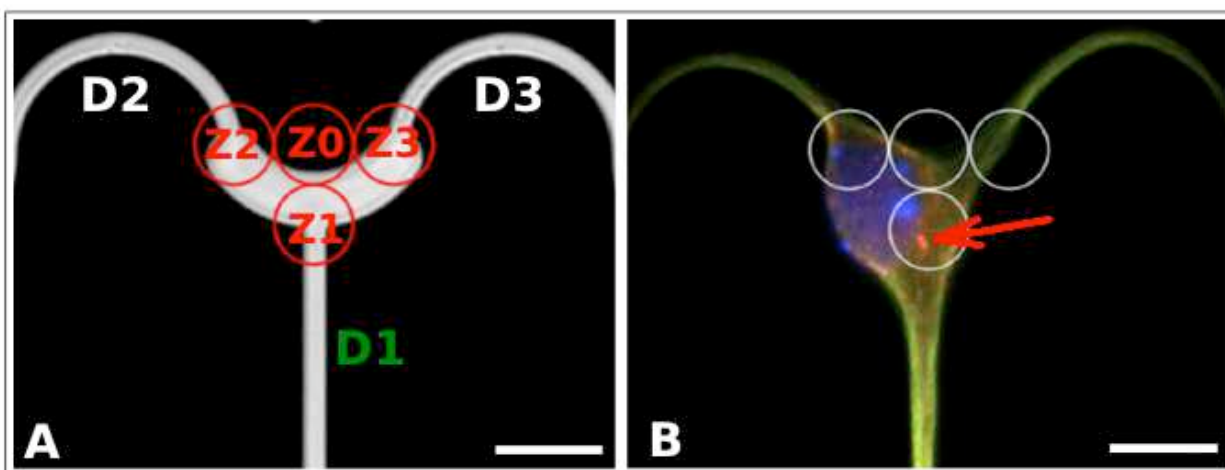


FIGURE 6.3: **Position du centrosome sur le motif $\text{BmW}_{2.00}$.** A/ Photo en transmission du motif $\text{BmW}_{2.00}$. Les zones d'intérêt Z0, Z1, Z2 et Z3 de sont superposées en rouge. Les trois directions D1, D2 et D3 de développement pour les neurites sont indiquées. B/ Photo d'un neurone fixé à 2 jours de culture et marqué tubuline tyrosinée (en vert), γ tubuline en rouge. Le noyau est superposé en bleu. Les zones d'intérêt sont reportées en blanc sur la photo. La barre d'échelle mesure $15\mu\text{m}$

Stade	Nombre de neurones	Z1		Z2		Z3		Z0		Autre	
Stade 2	39	10	25,6%	3	7,7%	8	20,5%	17	43,6%	1	2,6%
Stade 3	117	68	58,1%	14	12,0%	5	4,2%	22	18,9%	8	6,8%

TABLE 6.2: **Tableau récapitulatif des résultats du positionnement des centrosomes par zone, sur des neurones au stade 2 et 3.** La valeur des pourcentages correspondant est indiquée dans les cellules grisées.

Au stade 2, on s'attend pour ce motif à obtenir les mêmes résultats que pour le motif Cont-Bm, puisque les corps cellulaires adhèrent sur le même type d'emplacement. Comparons donc au stade 2 les résultats sur les deux types de motifs (Fig 6.4). Pour ces deux motifs une grande majorité des neurones ont leur centrosome dans l'axe de symétrie du motif, c'est à dire dans les zones Z1 et Z0 : 69% pour le motif $\text{BmW}_{2.00}$ contre 80% pour le motif Cont-Bm. Cette différence n'est pas significative à 5% ($\epsilon=1,2$; risque=0,23). Pour le motif $\text{BmW}_{2.00}$, 25,6% des neurones ont leur centrosome directement à l'entrée de la direction D1, contre 7,7% et 20,5% pour les deux autres

directions. Ce grand nombre de centrosomes présents au stade 2 à l'entrée de la direction D3 peut provenir de l'erreur statistique du au petit nombre d'échantillons mesurés (39). En effet, le pourcentage réel avec 95% de chance, peut se trouver entre 7,8 et 33,1%. Finalement, on retrouve quand même une majorité de centrosomes dans l'axe de symétrie, comme pour le motif Cont-Bm.

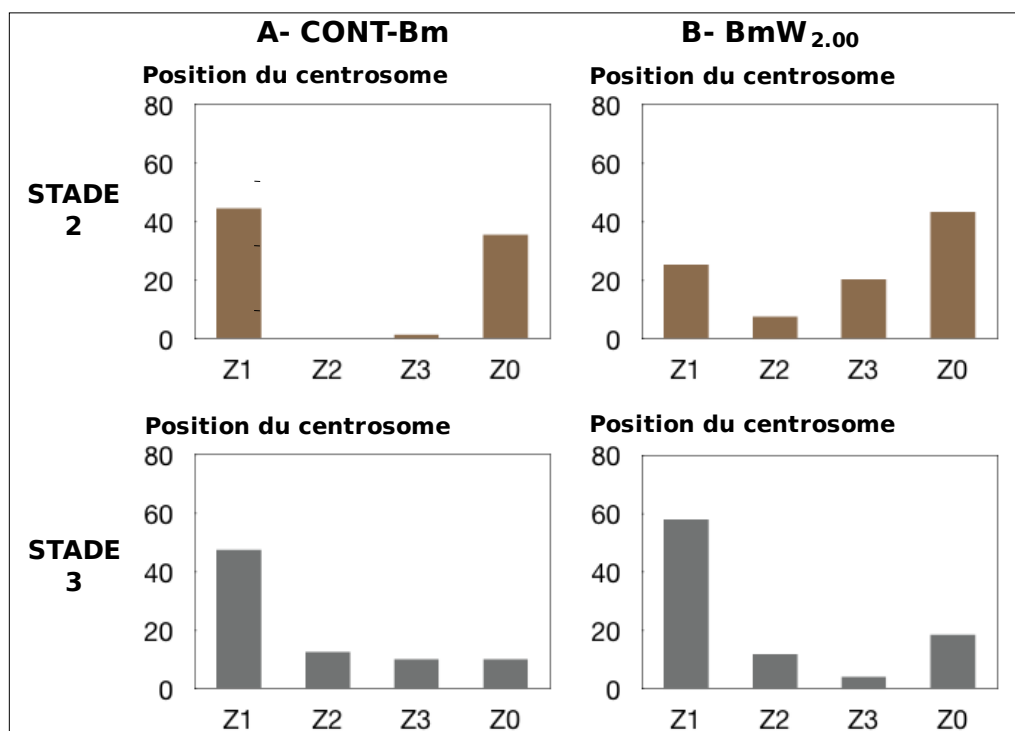


FIGURE 6.4: Comparaison des positions du centrosome sur les motif BmW_{2.00} et Cont-Bm, en fonction des stades de développement. A/ Pourcentage de neurones ayant leur centrosome dans chaque zone sur le motif Cont-Bm B/ Pourcentage de neurones ayant leur centrosome dans chaque zone sur le motif Bm_{gap}W_{2.00}.

Intéressons nous maintenant au stade 3 de développement. Nous avons vu pour le motif Cont-Bm qu'entre les stade 2 et 3, le nombre de centrosomes dans la zone Z0 diminue alors que ceux des zones Z1 Z2 et Z3 augmentent tous d'environ 10% (Fig 6.4). Cela nous avait donc conduit à penser que les neurones ayant leur centrosome dans la zone Z0 au stade 2 voyaient leur centrosome se diriger aléatoirement vers les trois zones aux entrées des neurites Z1 Z2 et Z3. Pour le motif BmW_{2.00} par contre, bien que le nombre de neurones ayant leur centrosome dans la zones Z0 diminue comme pour le motif Cont-Bm, seul le nombre de neurones ayant leur centrosome dans la zones Z1 augmente, passant de 25,6% à 58,1%. Il semble donc dans le cas de ce motif qu'une

grande partie des neurones qui avaient au stade 2 leur centrosome dans la zone Z0 l'aient au stade 3 dans la zone Z1. Comme pour le motif W_{2.00}, il semble donc que le neurone ne puisse pas ramener son centrosome vers l'entrée des directions D2 et D3. Cette incapacité serait-elle liée à la limitation de tension sur ces directions ? Enfin, si l'on compare la position des axones avec la position des centrosomes au stade 3, le pourcentage de centrosome à l'entrée de la direction D1 est inférieure, comme pour tous les autres motifs, au pourcentage d'axones développés dans la direction D1, révélant certainement encore une fois la dynamique de cet organite.

Ainsi, dans ce motif, non seulement nous arrivons à placer au stade 2 le centrosome préférentiellement dans l'axe de symétrie du motif dont 26% directement dans la zone Z1 grâce à la contrainte cellulaire mais également, il semble que nous empêchions les neurones avec leur centrosome dans la zone Z0 au stade 2 de se répartir aléatoirement vers toutes les directions D1, D2 et D3. Il semble donc qu'une limitation de tension le long des directions D2 et D3 empêche le mouvement du centrosome vers l'entrée de ces directions. Y aurait-il donc un lien entre le développement d'une tension interne suffisante et le mouvement du centrosome vers l'entrée du neurite ? Nous nous sommes donc intéressés aux neurones ayant au stade 3 leur centrosome dans les zones D2 et D3. 15 neurones sur 19 ont leur neurite décroché adhérent, ou beaucoup plus élargi, comme si l'on avait fixé le début ou la fin d'un décrochement (Fig 6.5). Ainsi, il semble que lorsqu'un neurone possède son centrosome à l'entrée des directions D2 et D3, les neurites des directions correspondantes développent une tension suffisamment importante pour les faire décrocher. Le fait que l'on ait pas 19 neurones sur 19 peut simplement relever de la dynamique du neurite, fixé à un moment précis de son développement. Ceci concorde tout à fait avec notre hypothèse évoquée plus haut que la limitation de tension sur les directions D2 et D3 empêche le mouvement du centrosome de la zone Z0 vers les zones Z2 et Z3, ainsi favorisant la pousse de l'axone dans la direction D1.

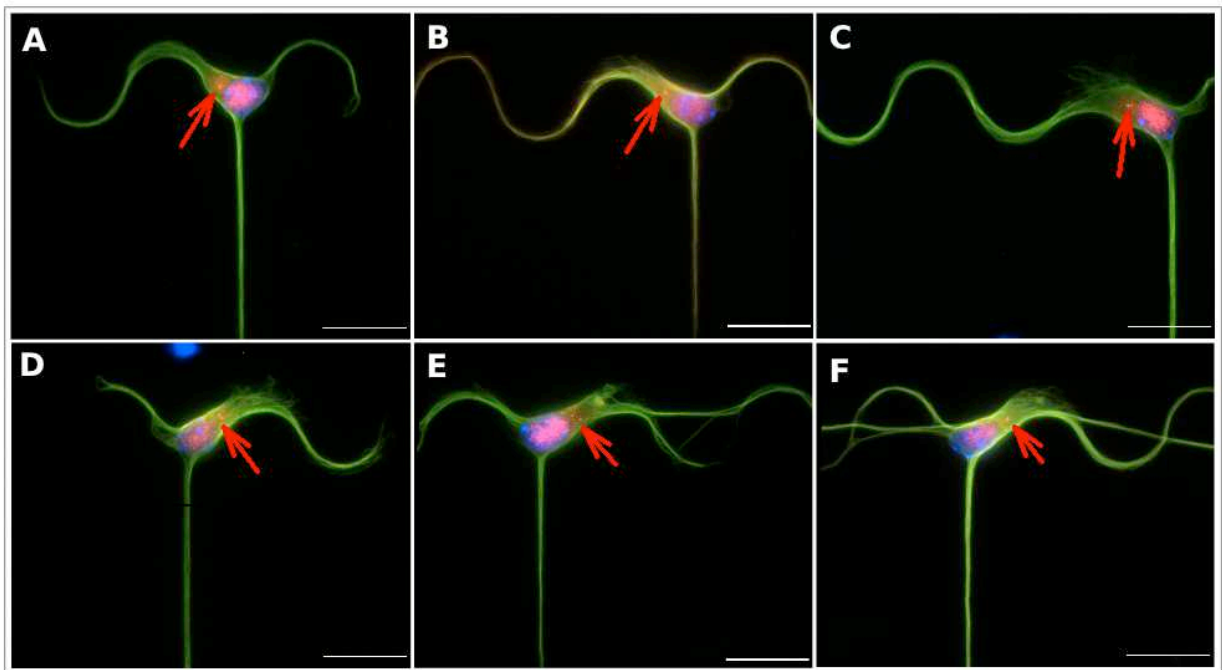


FIGURE 6.5: **Exemples de neurones avec leurs centrosomes dans les zones Z2 ou Z3 sur le motif BmW_{2.00}** A/ et B/ Le neurite dans la direction correspondant à la zone où se trouve le centrosome est élargi. C/et D/ Le neurite dans la direction correspondant à la zone où se trouve le centrosome est décroché mais encore adhérent. E/ et F/ Le neurite dans la direction correspondant à la zone où se trouve le centrosome est complètement décroché. La barre d'échelle mesure 20 μ m.

6.2 Amélioration du motif

Bien que les résultats du motif BmW_{2.00} soient déjà plus que satisfaisants, nous avons voulu améliorer le motif. L'une des idées que nous avons eu, présentée dans cette section, consiste à placer des gaps de zones hydrophobes à des endroits adéquats du motif. Cette idée de gaps était la première que nous avons eu pour orienter la position de l'axone. Le tout premier motif appelé 'Soleil' que nous avons réalisé ainsi que les résultats et conclusion auxquelles nous étions parvenu sont exposés dans une première partie. Le motif pour l'amélioration de la différenciation axonale est exposé dans une seconde partie.

6.2.1 Motif Soleil

Une de nos premières idées avait consisté à créer un motif en forme de soleil (Fig 6.6). Ce motif avait pour but d'orienter la position de l'axone tout en assurant une bonne survie de nos neurones en réseaux. Celui-ci comporte un plot de 20 μ m de diamètre, comparable à celui d'un

corps cellulaire afin de limiter le nombre de soma par plot. Wyart et al. (Wyart C, 2002) ont montré que la survie des réseaux de neurones patternés est meilleure avec des plots de plus de $80\ \mu\text{m}$ de diamètre, les neurones pouvant alors développer des autapses*. Nous avons donc décidé d'entourer le plot de courtes lignes en pointillés permettant aux neurites de se développer. Nous espérons ainsi à la fois limiter le nombre de neurones par plot et assurer une meilleure survie.

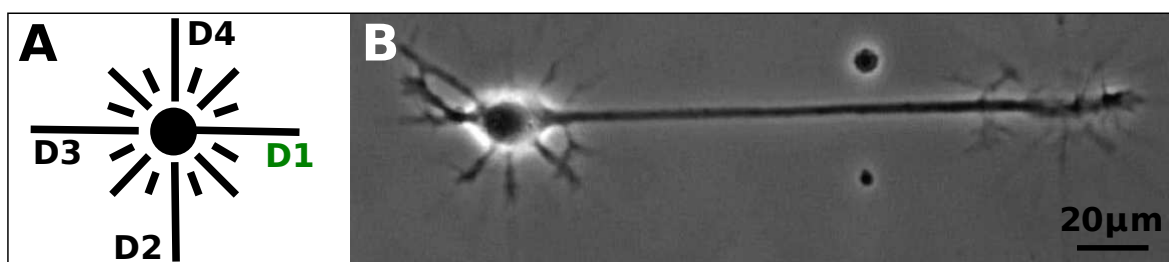


FIGURE 6.6: Motif 'Soleil' A/ Schéma du motif soleil. Les quatre directions utilisées sont inscrites (en vert, direction D1, la direction désirée pour la position de l'axone). Le plot mesure $20\ \mu\text{m}$ de diamètre, les lignes $3\ \mu\text{m}$ d'épaisseur. B/ Photo en contraste de phase d'un neurone à 2 jours de culture, développé sur un pattern soleil. Des neurites se développent sur les 'rayons' du soleil. Le plus long prolongement s'est développé le long de la direction D1.

Du plot émergent quatre chemins de $3\ \mu\text{m}$ d'épaisseur pour la croissance des neurites. Pour trois de ces chemins, des gaps hydrophobes s'étendent entre le plot et le début de la ligne. La taille du gap est de $2,5\ \mu\text{m}$ ou $3,5\ \mu\text{m}$ selon le motif. Seul un des chemins est directement connecté au plot. Nous pensions ainsi forcer l'axone à se développer sur ce chemin permissif. En effet, Stenger et al. (Stenger DA, 1998) ont montré que l'utilisation d'un pattern comportant un seul chemin en ligne pleine pour le développement des neurites force à $76\% \pm 11\%$ l'axone à s'y développer (2.2.2 page 60).

Positionnement de l'axone.

Une comptabilisation des positions de l'axone selon chaque direction sur les motifs soleils à $2,5$ et $3,5\ \mu\text{m}$ de gap, construits en réseau de huit par huit a été réalisée (Fig 6.7). Les résultats sont exposés dans le tableau 6.3.

Seuls 33% des neurones cultivés sur le motif soleil avec gap $2,5\ \mu\text{m}$ ont leur axone positionné sur le chemin permissif. Ce résultat n'est pas significativement différent de l'aléatoire à 5% ($\epsilon=1,85$, risque= $0,06$). Nous sommes donc d'autant plus loin des 76% obtenus par (Stenger DA, 1998) ce qui

*. Connexion d'un neurone avec lui-même.

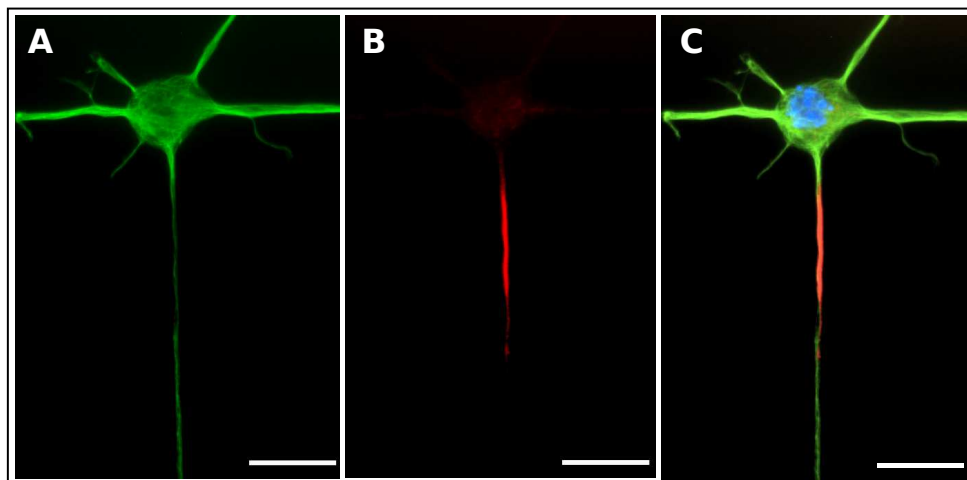


FIGURE 6.7: Neurone cultivé sur un motif 'Soleil', à 6 jours de culture. A/ Marquage de la tubuline tyrosinée. B/Marquage de l'ankyrin G. C/ Superposition de la tubuline tyrosinée (en vert), de l'ankyrin G (en rouge) et du noyau (en bleu). La barre d'échelle mesure $20\mu\text{m}$.

Taille du gap	Nombre de Neurones	D1		D2		D3		D4	
$2,5\mu\text{m}$	100	33	33%	22	22%	26	26%	26	19%
$3,5\mu\text{m}$	87	30	34,5%	17	19,5%	22	25,3%	18	20,7%

TABLE 6.3: Tableau récapitulatif de la position des axones de neurones à 6 jours de culture cultivés sur les patterns soleil. La taille du gap est indiquée dans la première colonne. Le nombre de neurones comptabilisés (bien placés, seuls sur un plot et marqués ankyrin) est indiqué dans la seconde colonne. La valeur des pourcentages correspondant, pour chaque direction est indiquée dans les cellules grisées.

peut être expliqué par la différence de notre motif. Celui de Stenger et al. est composé de lignes en pointillé tout le long des lignes non permissives pour l'axone alors que nous n'avons un gap qu'au début de la ligne. Ainsi, peut-être qu'en disposant des gaps sur toute la longueur de nos lignes non permissives, il serait possible de contrôler de manière plus efficace la position de l'axone? Cependant, nous obtenons les mêmes résultats que la publication plus récente de (Vogt AK, 2004) qui utilise quant à elle la même géométrie et qui trouve également un pourcentage de 35% d'axones orientés. Bien que ces résultats ne soient pas non plus significativement différents de l'aléatoire, nos résultats concordent pour une tendance à une légère orientation de l'axone dans la direction D1. Pour déterminer si cette légère orientation de l'axone est réellement significativement différente de l'aléatoire, il faudrait réaliser ce type de comptabilisation sur beaucoup plus de neurones. (En effet, plus la différence avec l'aléatoire est faible, plus le nombre de neurones à comptabiliser pour

prouver que la différence est significative doit être grand.)

D'autre part, on ne remarque pas d'augmentation d'orientation de l'axone dans la direction D1 pour un gap plus grand puisque pour le gap $3,5\mu\text{m}$, seuls 30% de neurones ont leur axone dans la direction D1. Ceci est bien conforme à la littérature puisque (Stenger DA, 1998) n'ont remarqué aucun changement en augmentant la taille des gaps. Finalement, nos résultats sont conformes à ceux exposés dans la littérature ce qui nous amène à penser que l'utilisation de gap pour le contrôle de la différenciation axonale n'est pas suffisante. Cependant, nous avons remarqué que le corps cellulaire se positionne nettement au milieu du plot, grâce à la présence des gaps autour du corps cellulaire.

6.2.2 Motif $\text{Bm}_{\text{gap}}\text{W}_{2.00}$

Un motif $\text{Bm}_{\text{gap}}\text{W}_{2.00}$ a été créé. Celui-ci est composé du motif Bm pour l'emplacement du corps cellulaire, et des ondulations de $\text{W}_{2.00}$ (Fig. 6.9). Sur les directions D2 et D3, les neurites doivent franchir un gap pour pouvoir se développer. Ce gap mesure $3\mu\text{m}$. Notons que contrairement au motif $\text{BmW}_{2.00}$ vu dans la première section de ce chapitre, le motif $\text{Bm}_{\text{gap}}\text{W}_{2.00}$ possède pour emplacement du corps cellulaire le motif Bm en entier.

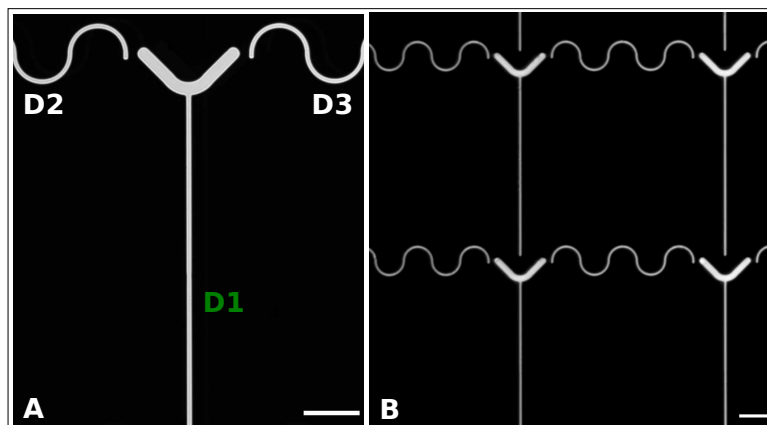


FIGURE 6.8: Motif $\text{Bm}_{\text{gap}}\text{W}_{2.00}$. Les barres d'échelles représentent $20\mu\text{m}$

En cultivant les neurones sur ce type de motif, nous nous sommes rendus compte que le corps cellulaire semblait systématiquement mieux placé que le même motif sans gap (non présenté dans ce manuscrit). Ainsi, la présence de ces deux gaps semble favoriser une position centrale du corps cellulaire. Une vidéomicroscopie nous a fournis une piste de compréhension (Fig 6.9). Il semble que le mouvement du corps cellulaire soit bloqué par les gaps.

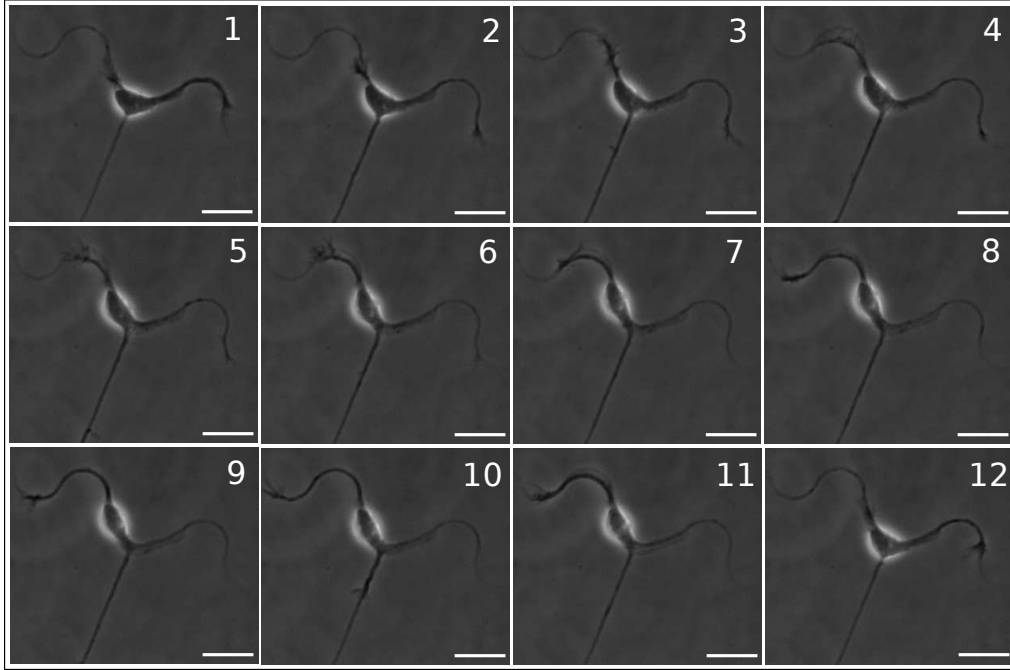


FIGURE 6.9: **Le mouvement du corps cellulaire est bloqué par le gap de $Bm_{gap}W_{2.00}$.** Vidéo-microscopie de neurone après l'ensemencement. Le corps cellulaire est tiré par le neurite de la direction D2. Ce mouvement est bloqué par le gap. Le corps cellulaire revient à la position attendue, au milieu du triangle (vignette 12). Les barres d'échelles représentent $20\mu m$

6.2.3 Facteur d'orientation

Le même type de quantification de la position des axones sur le motif $Bm_{gap}W_{2.00}$ a été réalisé (Fig. 6.10). Les résultats sont exposés dans le tableau 6.4.

Les résultats indiquent que 89,3% des neurones ont leur axone dans la direction D1. Ce résultat est significativement différent de l'aléatoire ($\epsilon=10,3$, risque $< 10^{-9}$), mais pas significativement différent du motif $BmW_{2.00}$ ($\epsilon=0,46$, risque = 64%). Ainsi, il semble que la présence de gaps n'augmente pas significativement l'efficacité de l'orientation.

Nombre de Neurones	D1		D2		D3	
75	67	89,3%	5	6,7%	3	4%

TABLE 6.4: **Tableau récapitulatif des positions des axones sur le motif $Bm_{gap}W_{2.00}$**

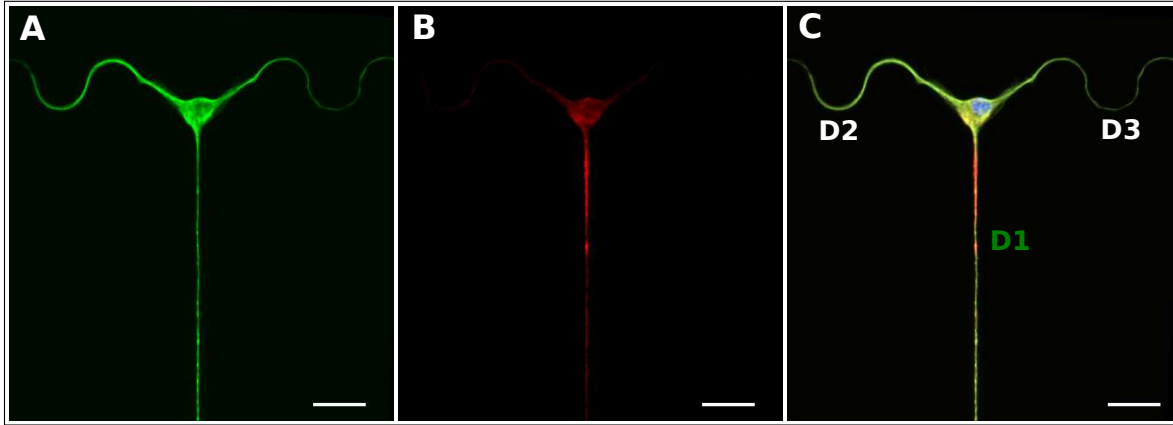


FIGURE 6.10: Neurone à 6 jours de culture sur un motif $Bm_{gap}W_{2.00}$. A/ Marquage de la tubuline tyrosinée. B/ Marquage de l'ankyrin G. C/ Superposition de la tubuline, de l'ankyrin G et du noyau. Les barres d'échelles représentent $20\mu m$

6.2.4 Position du centrosome

Les mêmes zones d'intérêt Z0, Z1, Z2 et Z3 que pour le motif Cont-Bm et $BmW_{2.00}$ ont été reportées sur le motif $Bm_{gap}W_{2.00}$ (Fig 6.11/A). Des marquages ont été réalisés afin de déterminer la position du centrosome (Fig 6.11/B). Les résultats des quantifications par zones d'intérêt sont reportés dans le tableau 6.5.

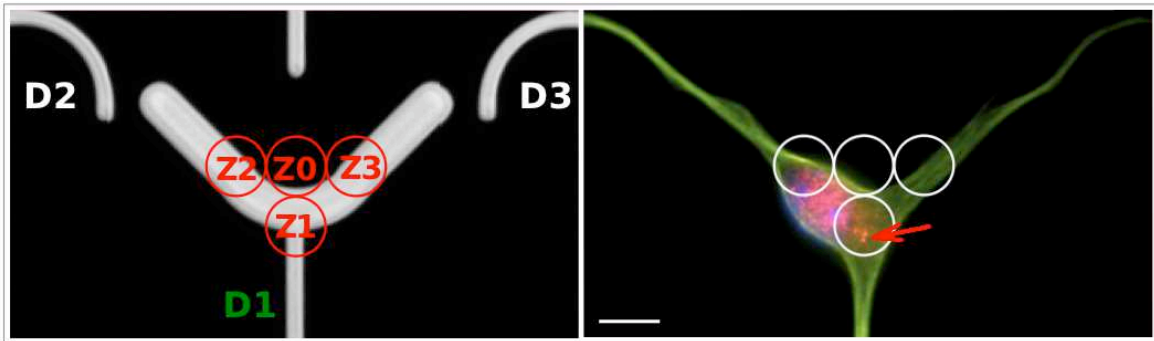


FIGURE 6.11: Position du centrosome sur le motif $Bm_{gap}W_{2.00}$. A/ Photo en transmission du motif $BmW_{2.00}$. Les zones d'intérêt Z0, Z1, Z2 et Z3 sont superposées en rouge. Les trois directions D1, D2 et D3 de développement pour les neurites sont indiquées. B/ Photo d'un neurone fixé à 2 jours de culture et marqué tubuline tyrosinée (en vert), γ tubuline en rouge. Le noyau est superposé en bleu. Les zones d'intérêt sont reportées en blanc sur la photo. La barre d'échelle mesure $3,5\mu m$

Au stade 2, on s'attend pour ce motif à obtenir les mêmes résultats que pour le motif Cont-Bm et $BmW_{2.00}$, puisque les corps cellulaires adhèrent sur le même type d'emplacement. Comparons donc au stade 2 les résultats sur ces trois types de motifs (Fig 6.12). Les résultats pour ce nouveau

motif concordent bien avec ceux de Cont-Bm et BmW_{2.00}. En effet, 69% des neurones ont leur centrosome dans l'axe de symétrie du motif contre 80% pour le motif Cont-Bm et 69% pour le motif BmW_{2.00}. La différence avec le motif Cont-Bm n'est pas significative à 5% ($\epsilon=1,46$; risque=0,14). Pour le motif Bm_{gap}W_{2.00}, 26,5% des neurones ont leur centrosome directement à l'entrée de la direction D1, contre 7,4% pour les deux autres directions. Ainsi, déjà au stade 2, on a comme pour le motif Cont-Bm un positionnement préférentiel du centrosome dans la zone Z1.

Stade	Nombre de Neurones	Z1		Z2		Z3		Z0		autre	
Stade2	68	18	26,5%	5	7,4%	5	7,4%	29	42,6%	11	16,2%
Stade3	152	101	66,4%	2	1,3%	12	7,9%	30	19,7%	7	4,6%

TABLE 6.5: Tableau récapitulatif des positions du centrosome sur le motif Bm_{gap}W_{2.00}

Le comportement entre le stade 2 et 3 est identique à celui du motif BmW_{2.00}. En effet, le

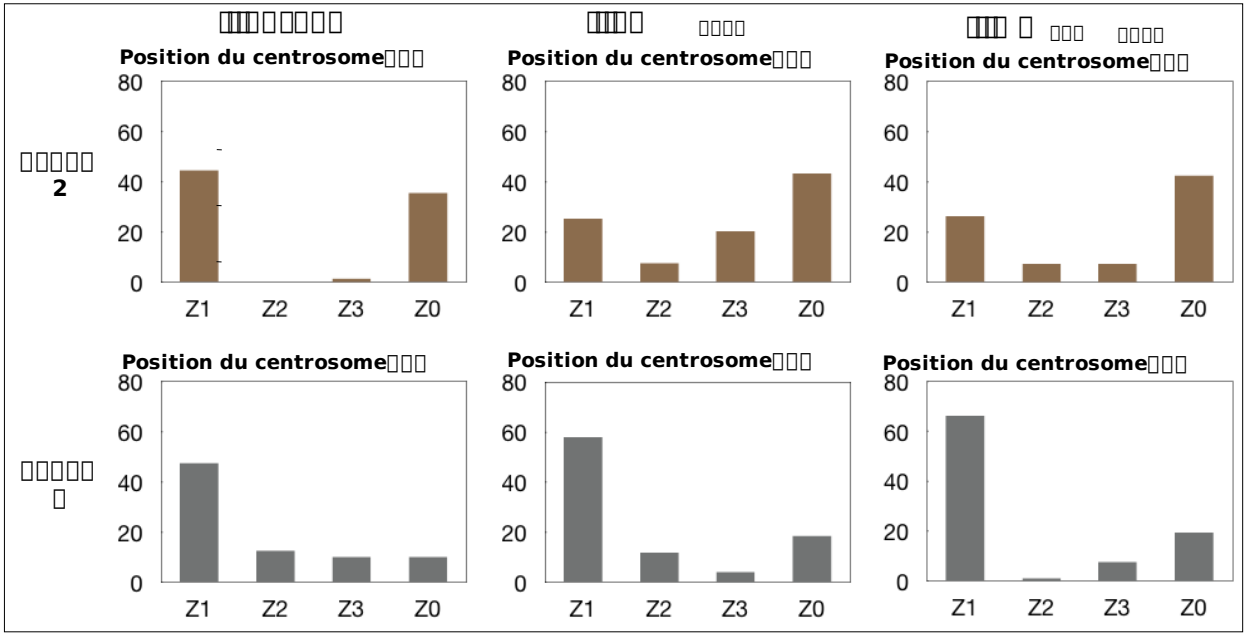


FIGURE 6.12: Comparaison des positions du centrosome sur les motif Cont-Bm, BmW_{2.00} et Bm_{gap}W_{2.00} en fonction du stade de développement. A/ Pourcentage de neurones ayant leur centrosome dans chaque zone sur le motif Cont-Bm. B/ Pourcentage de neurones ayant leur centrosome dans chaque zone sur le motif BmW_{2.00}. C/ Pourcentage de neurones ayant leur centrosome dans chaque zone sur le motif Bm_{gap}W_{2.00}.

nombre de centrosomes dans la zone Z0 diminue alors que seul celui de la zone Z1 augmente significativement passant de 26,5% à 66,4% (Fig 6.12). La différence de pourcentage dans la zone Z1 au stade 3 entre les motifs BmW_{2.00} et Bm_{gap}W_{2.00} n'est pas significativement différente à 5%

($\epsilon=1,18$, risque=0,27). Les résultats entre ces deux motifs sont donc statistiquement identiques. Ainsi, le gap ne semble pas ni influencer sur le position du centrosome au stade 2 ni au stade 3. Il n'introduit donc pas un obstacle plus grand pour ramener le centrosome vers les zones Z2 et Z3. Nous avons également remarqué pour ce motif que sur les 14 neurones avec leur centrosome dans les zones Z2 et Z3 au stade 3, 10 neurones ont leur neurite dans la direction correspondante au placement du centrosome plus élargi ou décroché (8 ont leur neurite dans la direction correspondante au placement du centrosome décroché encore adhérent ou complètement décroché). Il semble

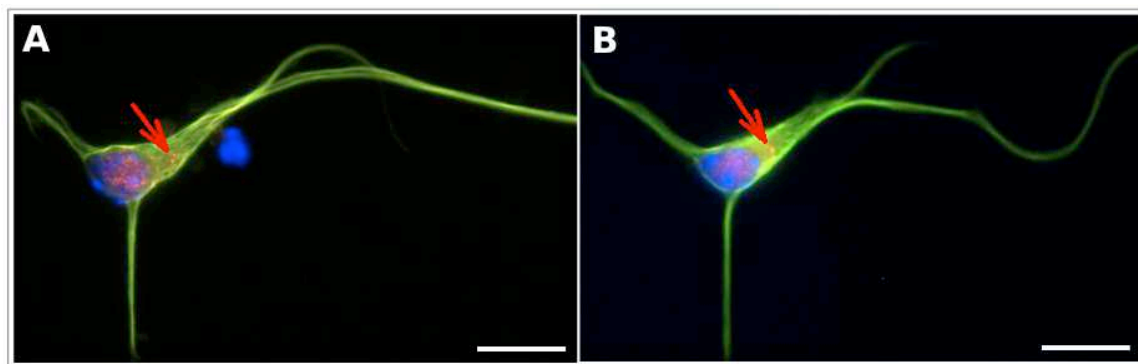


FIGURE 6.13: Exemples de neurones avec leurs centrosomes dans les zones Z2 ou Z3 sur le motif $Bm_{gap}W_{2.00}$. Le neurite dans la direction correspondant à la zone où se trouve le centrosome est complètement décroché. La barre d'échelle mesure $15\mu m$.

donc, comme pour le motif $BmW_{2.00}$ que dans les rares cas où le centrosome se trouve à l'entrée d'un des neurites ondulés, celui-ci développe une tension interne importante.

Finalement le motif $Bm_{gap}W_{2.00}$ nous confirme que le fait que l'on ne prenne qu'une petite partie du boomerang Bm pour l'emplacement du corps cellulaire ne change pas le comportement des neurones lors de leur développement. Bien qu'il n'apporte pas une orientation plus importante de l'axone dans la direction D1, les corps cellulaires semblent plus stabilisés sur le motif Bm grâce à la présence des deux gaps. Cette avancée n'est pas un détail pour l'élaboration reproductible de mini-réseaux de neurones.

Pour conclure, nous avons créé deux motifs permettant de contrôler la différenciation axonale à plus de 88%. Ce résultat, plus que satisfaisant, a été réalisé en exploitant deux contraintes géométriques jouant sur deux aspects de la différenciation axonale. Ce succès d'orientation à plus de 88% avec des patterns d'une grande simplicité de réalisation ouvre de nombreuses possibilités d'expériences sur les réseaux de neurones, où le contrôle du sens de l'information est primordial.

Chapitre 7

Discussion et perspectives

Sommaire

7.1	Bilan de nos résultats et utilisation de nos motifs	147
7.1.1	Bilan de nos résultats	147
7.1.2	Un outil pour le placement de l'axone : les atouts et les limites.	148
7.2	Les pistes ouvertes par nos travaux	149
7.2.1	La génération de tension dans les neurites	149
7.2.2	Le rôle du centrosome dans la différenciation axonale	151
7.3	Les perspectives	152
7.3.1	Déterminer quels paramètres des ondulations des motifs 'wavy' jouent sur la différenciation axonale.	153
7.3.2	Confirmer le rôle de la tension dans la différenciation axonale.	153
7.3.3	Déterminer les acteurs biologiques du développement d'une tension in- terne dans le neurite.	154
7.3.4	Déterminer la corrélation entre tension interne et mouvement du cen- trosome.	155

Le contrôle de l'orientation de l'axone à plus de 80% en utilisant uniquement des contraintes physiques est non seulement un outil très intéressant en lui-même mais pose également des questions fondamentales sur les mécanismes de la différenciation axonale. Nous rappellerons dans une première section le bilan de nos résultats puis insisterons sur les atouts et les limites de l'outil que nous avons développé. Dans une deuxième section, nous aborderons les pistes et questions ouvertes par nos travaux. Enfin, nous proposerons diverses expériences qui pourraient être menées pour tenter de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu.

7.1 Bilan de nos résultats et utilisation de nos motifs

7.1.1 Bilan de nos résultats

Au fil de notre travail, nous avons dessiné des motifs originaux, exploitants des propriétés connues de la différenciation axonale, dans le but de contrôler la position de l'axone. Un premier motif, tout en nous fournissant un résultat encourageant pour la polarisation axonale, nous a permis d'identifier deux types de contraintes. Une contrainte appliquée sur le corps cellulaire, et une deuxième appliquée sur les neurites.

Notre contrainte cellulaire avait pour but de contrôler précocement la position du centrosome afin d'influencer le développement de l'axone dans la direction la plus proche de cette position. En cultivant un neurone sur un pattern en forme de boomerang, nous avons en effet montré qu'il est possible de contrôler à 80% la position du centrosome au stade 2 le long de l'axe de symétrie du pattern, la moitié se trouvant directement à l'entrée de la direction désirée pour la pousse de l'axone. Les neurones au stade 3, montrent effectivement une orientation axonale préférentielle dans cette direction à 57%.

La seconde hypothèse que nous avons exploitée, appuyée sur des résultats de la littérature, consiste à penser qu'un neurite doit franchir un seuil de tension pour pouvoir se différencier en axone. Des motifs originaux ont donc été dessinés dans le but de limiter la tension sur trois des quatre chemins possibles de développement des neurites. Nous avons montré grâce à ces motifs que plus on augmente la limitation de tension sur trois des chemins, plus l'axone se développe préférentiellement dans la direction du quatrième.

Enfin, nous avons combiné les deux types de contraintes trouvées dans le but d'un contrôle optimal de la différenciation axonale. Grâce aux motifs dessinés, nous sommes arrivés à contrôler la position de l'axone à plus de 88%.

Pour conclure, nous sommes arrivés, sans molécules d'adhésion spécifiques ni facteurs attractants, à contrôler la position de l'axone, en utilisant uniquement des contraintes géométriques exploitant différents aspects de la différenciation axonale.

7.1.2 Un outil pour le placement de l'axone : les atouts et les limites.

Contrôler la position de l'axone peut intéresser de nombreux chercheurs, d'autant plus que notre méthode est facilement réalisable et adaptable à toute géométrie de réseau. Cela pourrait faciliter, par exemple, l'étude de protéines spécifiques de l'axone. Au lieu de travailler à partir de cultures aléatoires, où les prolongements s'entrecroisent et où l'axone doit forcément être marqué, le chercheur travaillerait sur des neurones dont les prolongements suivent des lignes, avec une chance à plus de 88% de posséder l'axone à l'endroit désiré.

Pour notre part, notre travail s'inscrit dans le projet 'Neurofet' dont le but consiste à créer des réseaux de neurones modèles sur des nanotransistors pour comprendre quelques mécanismes fondamentaux de la communication en réseaux. Le fait de contrôler la position de l'axone rend alors possible la création de mini réseaux identiques avec une bonne statistique. Un exemple de ce type de mini-réseau réalisé est présenté dans la figure 7.1. En effet, pour un mini réseau de

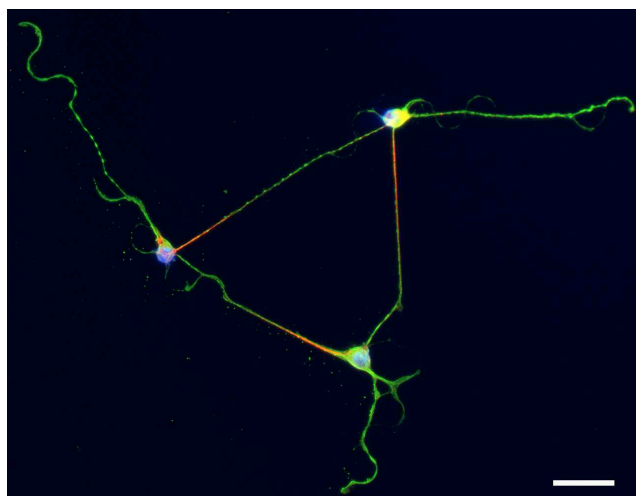


FIGURE 7.1: **Exemple de réseau à trois neurones correctement orientés cultivés sur les motifs BmW_{2,00}.** En vert : tubuline tyrosinée. En rouge : Ankyrin G. En bleu : noyau. La barre d'échelle mesure 40 μ m.

trois neurones par exemple, nous aurions 67% de chances d'avoir les trois neurones correctement orientés. Lorsque l'on compare à un motif aléatoire, où le pourcentage de chance descend à moins de 5%, l'avancée expérimentale est indéniable. Cependant, on ne peut tout de même pas s'affranchir

de réaliser de nombreux mini réseaux pour ces expériences. En effet, il existe tout de même, outre le contrôle de la position de l'axone, d'autres facteurs réduisant notre pourcentage de posséder un même réseau. Les trois emplacements pour les corps cellulaires peuvent ne pas être occupés par un seul neurone, il peut y avoir différents types de neurones et les neurites ne s'arrêtent pas forcément au plot suivant mais peuvent connecter le neurone deux plots après par exemple. Le problème du placement des corps cellulaires sera résolu dans le cadre de sa thèse Ghislain Bugnicourt grâce à un positionnement systématique d'un neurone par emplacement cellulaire lors de l'ensemencement, en plaçant une cellule par plot grâce à des micropipettes manipulables. Les autres paramètres, cependant, ne sont pas si facilement solvables. Les mini-réseaux devront donc être marqués à posteriori de l'enregistrement.

7.2 Les pistes ouvertes par nos travaux

Nous avons vu dans la première partie de ce manuscrit (partie 1.3.1, page 33) que tous les neurites ont la capacité de devenir des axones. Lorsque nous ensemençons les neurones sur nos motifs, l'axone devrait avoir une position aléatoire, comme pour notre motif contrôle. Cependant, nous avons vu que nous arrivons à forcer la différenciation dans une direction privilégiée. Quels sont donc les mécanismes qui, du fait des contraintes que nous faisons subir aux cellules, ne peuvent pas être mis en place dans les neurites qui se développent selon les autres directions ? Ce contrôle de la position de l'axone est-il réellement du au fait que l'on empêche le franchissement d'un certain seuil de tension, ou d'autres hypothèses peuvent être envisagées ? Quel rapport y-a-t-il avec la position du centrosome ?

7.2.1 La génération de tension dans les neurites

Nous avons supposé que le succès d'orientation de l'axone avec nos motifs wavy provenait de la limitation de tension sur les chemins ondulés, empêchant un neurite de dépasser un certain seuil de tension interne, nécessaire pour se différencier en axone. Cependant, d'autres hypothèses pouvaient être avancées, expliquant une différenciation axonale préférentielle vers la direction D1 rectiligne. Par exemple, on aurait pu supposer que la pousse des neurites soit génée par cette courbure imposée, de sorte qu'une pousse plus rapide dans la direction D1 entraîne la différenciation axonale dans cette direction*. Au vu des vidéomicrocopies réalisées, nous nous sommes rendu compte que

*. Lors de la différenciation, le neurite qui deviendra l'axone pousse 5 à 10 fois plus vite que les autres neurites (Barnes AP, 2009).

non seulement les neurites ne sont pas gênés lors de leur pousse sur des chemins ondulés, mais en plus, on peut voir nettement qu'ils essaient de se tendre, et décrochent lorsque la tension devient trop importante. Cela concorde donc bien avec notre idée de départ. Le même motif $W_{2,00}$ en tranchées, rendant au neurite la possibilité de se tendre malgré les ondulations, élimine l'effet d'orientation. Les images MEB réalisées montrent clairement l'état tendu du neurite. Il semble donc que notre hypothèse de départ soit vraisemblable.

Cependant, de nombreuses questions restent encore en suspens. En effet, imaginons que nous ayons, au lieu de notre demi cercle du $W_{2,00}$ de $20\mu\text{m}$ de diamètre à la base des ondulations, un demi cercle de $60\mu\text{m}$ de diamètre. Bien que la force résultante suivant la verticale soit la même, il semble intuitivement que la contrainte appliquée sur le neurite serait alors plus faible. Serait-ce relié à une longueur de persistance ? A un nombre de points d'adhésions, comme ceux décrits par Jaehrling et al. (Jaehrling S, 2009) ? Ainsi, il reste à déterminer si la courbure et la période peuvent également influencer la différenciation axonale, indépendamment de la force résultante induite par le motif.

Une autre question provient du comportement des neurites lors du décrochement, et de la manière dont la tension interne peut s'exercer, en liaison ou pas avec l'adhésion. En effet, une fois décroché, il semble que les mécanismes ne soient pas aussi simple que ce que nous l'avons imaginé, consistant à supposer que lorsque le neurite est décroché, n'ayant plus d'adhésion, il ne peut plus se tendre et donc se différencier en axone. En effet, on voit sur des vidéo-microscopies qu'il est encore possible de transmettre une tension même si une partie du neurite est décroché (mouvement du corps cellulaire tiré alors qu'une partie du neurite est décroché). De même 60% des axones développés sur les directions ondulés sur le motif $W_{2,00}$ sont complètement décrochés. Notons que les axones ont l'air beaucoup plus instables sur les ondulations que le sont les dendrites. Notre hypothèse selon laquelle si la tension interne d'un neurite sur une ondulation augmente trop, le neurite décroche et ne peut plus développer de tension puisqu'il n'est plus adhérent semble donc certainement trop simpliste, d'autant plus que nous avons remarqué qu'un neurite décroché peut se raccrocher au passage d'une vague. Ce qui paraît par contre évident au vu de nos résultats est que le neurite adhère sur toute sa longueur. En effet, si ce n'était pas le cas, dès que le cône de croissance exercerait une tension à son extrémité, le neurite se tendrait et décrocherait. Nos observations nous suggèrent donc qu'il existe des points d'adhésion répartis tout le long du neurite, en accord avec les 'clutches' d'adhésion décrits dans la littérature (Jaehrling S, 2009) (O'Toole M, 2008) (voir partie 1.3.2 page 41). Nous pouvons également déduire de notre travail que la tension n'est pas

développée uniquement par le cône de croissance. On voit nettement sur des vidéo-microscopies que des parties du neurite près du corps cellulaire se tendent alors que le reste du neurite, plus proche du cône de croissance, suit clairement les ondulations (voir Fig.5.16 page 123). Cela se produit après le passage de vagues, décrites dans la littérature comme apportant de la matière nouvelle au cône de croissance (Ruthel G, 1998b). Celles-ci semblent donc pouvoir induire une tension plus importante au niveau du neurite. Cela est compatible avec leur structure, identique à celle du cône de croissance. Elles sont donc probablement capables d'exercer des forces du même ordre de grandeur que celui-ci (voir partie 1.11, page 28).

7.2.2 Le rôle du centrosome dans la différenciation axonale

La position du centrosome semble bien avoir un rôle important dans la différenciation axonale puisque le contrôle au stade 2 de développement entraîne une direction préférentielle de la pousse de l'axone dans la direction correspondante. Ainsi, comme montré par de Anda et al. (de Anda FC, 2005), il semble, au vu de nos résultats sur le motif Cont-Bm, que la position du centrosome puisse influencer la position de l'axone. Quels mécanismes moléculaires pourraient être induits par cette position du centrosome à l'entrée du neurite ? Le prolongement leader des neurones migrants bipolaires présente certaines similarités avec l'axone. Le centrosome se positionne à l'entrée de chacun d'eux lors de leur développement. Les microtubules sont également tous orientés avec leur bout plus vers la partie distale de ces prolongements (Vallee RB, 2009) (Baas PW, 1988). Or, il a été suggéré, pour les prolongements leader des neurones bipolaires, que le centrosome pourrait avoir un rôle de stabilisation de ces prolongements (Higginbotham HR, 2007) (voir partie 1.3.1 page 33 mettre plutôt la ref). Ainsi, nous pouvons penser que la position du centrosome à l'entrée d'un neurite permettrait sa stabilisation. La stabilisation des microtubules d'un des neurites est d'ailleurs un signal physiologique spécifiant la polarisation axonale (Witte H, 2008b). De cette stabilisation des microtubules d'un des neurites est supposée découler un transport sélectif (Reed NA, 2006) (Jacobson C, 2006) (voir partie 1.3.1 page 31), qui expliquerait le déroulement de la différenciation axonale. Ainsi, la position du centrosome à l'entrée d'un neurite pourrait induire une stabilisation des microtubules du prolongement, qui elle-même induirait un transport sélectif vers ce prolongement.

Plusieurs questions se posent alors. Cette position du centrosome est-elle le prémice de la différenciation en axone ou en est-elle une conséquence ? Cette position du centrosome est-elle nécessaire pendant un laps de temps défini ?

Chez les neurones migrants bipolaires et leur prolongement leader, le centrosome à l'entrée du prolongement ne semble être nécessaire que pendant un court laps de temps (Higginbotham HR, 2007). Il en est de même chez les neurones granulaires du cervelet pour la pousse de leur second axone (Zmuda JF, 1998) (voir partie 1.3.1 page 31). Nos résultats confirment également ces observations puisque le centrosome semble être très dynamique lors du développement du neurone et ne se positionner à l'entrée de l'axone que pendant un laps de temps défini. Zmuda et al. ont également montré que le mouvement du centrosome vers l'entrée du second axone lors de sa croissance ne se fait qu'après que celui-ci ait commencé à émerger. L'auteur suggère d'ailleurs que les forces développées par le nouveau cône de croissance pourraient affecter la position de cet organite cellulaire. Cette hypothèse va dans le même sens que nos résultats. Il semble en effet que le mouvement du centrosome puisse être corrélé au développement d'une tension plus importante au niveau d'un des neurites. En effet, lorsque la tension est limitée sur un chemin ondulé, le neurite semble ne plus pouvoir ramener le centrosome vers son entrée (voir partie 6.1.3 page 135). De plus, lorsque le centrosome se retrouve à l'entrée de l'une des directions ondulées, le neurite montre souvent une tension plus élevée que celle imposée par le motif puisqu'il est dans la majorité des cas décroché. Ainsi, le centrosome pourrait être ramené par le développement d'une tension interne au niveau de l'entrée du neurite, permettant alors de stabiliser le prolongement, permettant à son tour un transport sélectif vers ce prolongement. Si cela est le cas, la position du centrosome serait bien nécessaire à l'établissement de l'axone mais elle en serait une conséquence du franchissement d'un seuil de tension interne. Enfin, nous avons également observé que les centrioles du neurone peuvent avoir un mouvement distinct (voir partie 4.3.3 page 100). Comme les cellules en mitose, le centriole fils présente des mouvements dans toute la cellule, alors que le centriole père ne bouge que très peu (Chevrier V, 2002). Ce n'est d'ailleurs pas la première fois dans la littérature que des corrélations entre le comportement de cellule en mitose et le développement du neurone sont exposés (Baas, 1999). Dans notre vidéomicroscopie, le centriole fils se déplace à l'entrée de chaque neurite lors de son élongation. Les centrioles pourraient donc avoir un rôle différent dans le développement du neurone. Reste alors à déterminer le rôle de chacun des centrioles dans la différenciation axonale.

7.3 Les perspectives

Nous présentons dans cette section les expériences qui permettraient de confirmer ou infirmer les hypothèses que nous avons formulées dans la partie précédente.

7.3.1 Déterminer quels paramètres des ondulations des motifs 'wavy' jouent sur la différenciation axonale.

Comme nous l'avons vu dans notre discussion, nous n'avons pas déterminé l'influence de la courbure et de la période des ondulations sur la différenciation axonale. La figure 7.2 présente le type de motifs que nous pourrions créer afin de répondre à ces questions. Une dernière expérience pourrait être réalisée en utilisant non pas de la polylysine mais une molécule pour laquelle l'adhésion est plus importante comme la laminine. La force d'adhésion étant plus importante, la tension limite imposée par le motif sur les chemins ondulés serait plus grande ($T_{lim} = \frac{F_{adhesion}}{\alpha}$). Si notre modèle est correct, nous devrions donc avoir une orientation des axones dans la direction D1 moins importante.

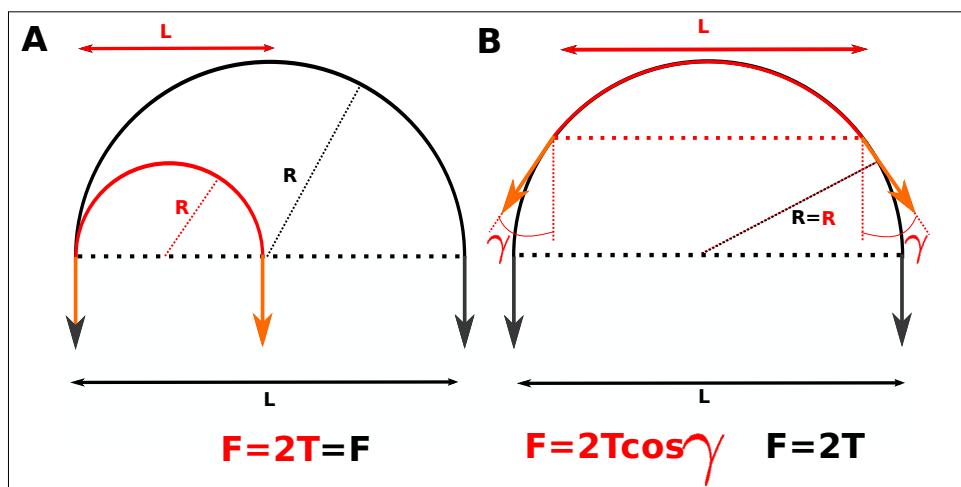


FIGURE 7.2: Déterminer l'influence des différents paramètres des ondulations sur la différenciation axonale : de nouveaux motifs. A/ Faire varier la courbure et sans faire varier la force résultante verticale due à la tension interne T du neurite. B/ Faire varier la force résultante verticale sans faire varier la courbure.

7.3.2 Confirmer le rôle de la tension dans la différenciation axonale.

Bien que nous ayons montré que le franchissement d'un seuil de tension interne dans un des neurites semble vraisemblablement être l'un des premiers signes de la différenciation axonale, l'idéal serait de pouvoir mesurer les tensions développées par les neurites au cours de la différenciation axonale. Nous avons donc commencé à mettre en place une expérience de mesure de force avec des gels de polyacrylamide remplis de microbilles fluorescentes (technique détaillée dans la partie 2.1.3, à la page 51). La première étape consistera à filmer le mouvement des billes induites par

les forces développées par le neurone lors de sa différenciation sur le gel. Nous pourrions alors à déterminer si l'un des neurites développe des forces plus importantes que les autres avant de se différencier en axone. La figure 7.3 montre les premiers résultats obtenus : des neurones à 3 jours de culture sur des gels de polyacrylamide remplis de microbilles fluorescentes. Nous travaillons

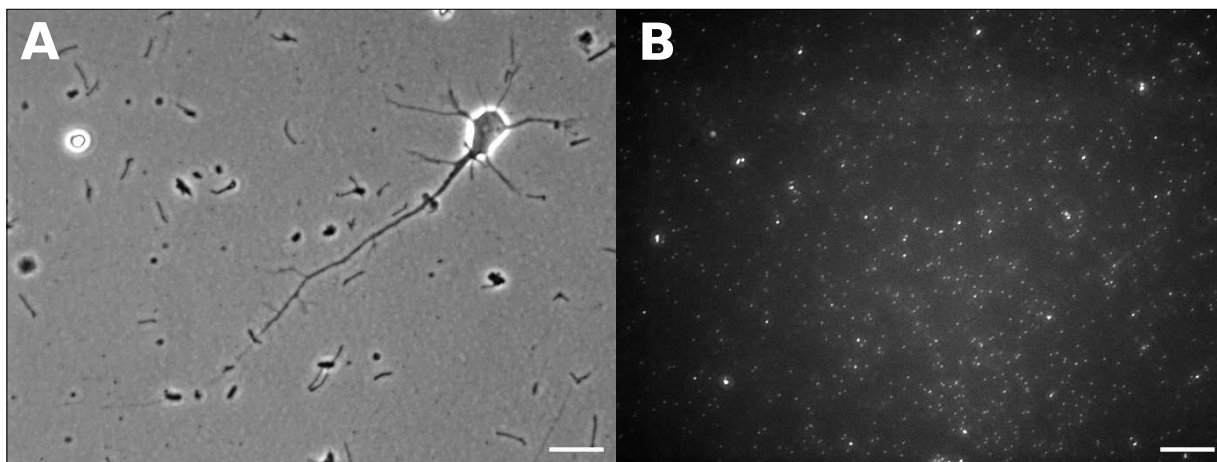


FIGURE 7.3: **Neurone à 3 jours de cultures, développés sur un gel de polyacrylamide rempli de microbilles fluorescentes.** A/ Photo en transmission d'un neurone cultivé sur un gel. B/ Photo en fluorescence de la même zone, révélant les microbilles fluorescentes présentes dans le gel. L'échelle indique $20\mu\text{m}$.

pour ce projet en collaboration avec Alice Nicolas, du LTM (CNRS-Grenoble).

7.3.3 Déterminer les acteurs biologiques du développement d'une tension interne dans le neurite.

Outre la mesure quantitative d'une tension seuil, il serait extrêmement intéressant de caractériser les acteurs biologiques impliqués dans les mécanismes que nous avons mis en exergue. Notamment, nous avons vu, dans l'exposé de la revue publiée par Baas et al. (Baas PW, 2001) (partie 1.3.2 page 37) que des études pharmacologiques ont été réalisées sur les neurones afin de déterminer le rôle des éléments du cytosquelette ainsi que de certains moteurs moléculaires dans la génération de forces. Nous souhaitons donc réaliser le même type d'études sur nos motifs pour mieux caractériser les mécanismes mis en jeu.

Des expériences préliminaires avec de la cytochalasine B[†] ou du nocodazole[‡] ont été effectuées avec des neurones cultivés sur nos motifs W_{2,00} après un jour de culture. La cytochalasine B, dans

[†]. bloque l'addition des monomères d'actine au bout +.

[‡]. inhibe la polymérisation de la tubuline.

les concentrations que nous avons testé (1 à 4 μM), ne semble pas avoir d'effet sur l'orientation des axones. Par contre, 64nM de nocodazole dans le milieu de culture entraîne une perte d'orientation préférentielle sur le motif $W_{2.00}$. Le pourcentage d'axones décrochés reste similaire aux autres cultures, révélant une dynamique similaire de l'axone développé sur les ondulations. Notons qu'il a été déjà supposé que le développement de forces supérieures à 3pN requiert la coopération des microtubules avec l'actine (voir partie 1.2.2 page 26). Ainsi, le fait que nous ayons dépolymérisé les microtubules pourrait éliminer cette capacité à générer ce type de forces. Il serait intéressant d'essayer un inhibiteur de la myosine 2, la blebbistatin par exemple, qui est supposée découpler la coopération entre les microtubules et les microfilaments d'actine. Cependant, si l'on imagine que la cellule n'arrive plus à générer des forces supérieures à 3pN, ceci n'expliquerait pas que l'on obtienne une même dynamique des axones qui sont arrivés à pousser sur les ondulations. Notons que l'administration de la même concentration de nocodazole sur des neurones migrants bipolaires entraîne des changements de direction fréquents comparé aux cellules contrôles (Baudoin JP, 2008). Ce parallèle entre l'incapacité pour le prolongement leader de choisir une direction et l'incapacité de choisir le neurite adéquat qui deviendra l'axone est troublant et reste certainement à creuser. Bien que ces résultats soient encore préliminaires, ils nous laissent entrevoir de passionnantes découvertes sur le rôle de différents éléments connus pour jouer un rôle dans l'établissement des forces au sein de cellules en liaison avec les mécanismes que nous avons découverts. Nos deux types de motifs jouant uniquement sur la contrainte neuritique, $W_{2.00}$, et la contrainte cellulaire, Cont-Bm, sont donc de formidables outils pour démarrer des études sur les acteurs biologiques et leur rôle dans chacun des mécanismes mis en exergue dans ce travail.

En complément de ces études sur cellules fixées, nous pourrions également réaliser des vidéomicroscopies, en marquant par exemple l'actine ou la myosine 2, dont nous possédons les plasmides. Ces vidéos pourraient nous être très utiles pour élucider comment se décrochent les neurites, le passage des vagues et leur influence sur les décrochements par exemple.

7.3.4 Déterminer la corrélation entre tension interne et mouvement du centrosome.

Nous avons pu voir au fil de nos résultats qu'une relation entre l'établissement d'une tension interne et le mouvement du centrosome est envisageable. Afin de déterminer si le mouvement du centrosome vers l'entrée du neurite est réellement corrélé au développement d'une tension interne plus importante dans le neurite correspondant, trois expériences pourraient être réalisées.

La première consisterait à exercer, grâce à une pipette fonctionnalisée, une tension extérieure sur un des neurites au stade 2 de développement et à filmer simultanément en fluorescence le mouvement du centrosome. Ceci pourrait être réalisable sur cellules transfectées avec un marqueur du centrosome ou sur des neurones de souris génétiquement modifiées pour exprimer de la centrine GFP fluorescente (Higginbotham H, 2004). Ainsi, nous pourrions déterminer si le fait de tirer sur un neurite à l’opposé du centrosome a pour conséquence de le ramener à son entrée, ce qui expliquerait le rôle de cette tension extérieure appliquée dans sa différenciation en axone.

Une seconde expérience consisterait à filmer la position du centrosome lors du développement des neurones sur nos motifs avec les ondulations. Ainsi, nous pourrions déterminer si le mouvement du centrosome vers l’entrée des neurites est corrélé avec les décrochements observés sur les ondulations. Un ajout extrêmement intéressant à cette expérience serait de filmer simultanément le moteur moléculaire kif5C550-YFP (Jacobson C, 2006) qui se concentre au niveau de l’axone au stade précoce de sa différenciation (Fig.7.4). Ainsi nous pourrions déterminer si la concentration de ce moteur moléculaire dans un des neurites est antérieur ou postérieur au mouvement du centrosome vers l’entrée du neurite[§]. Nous pourrions également réaliser la même expérience avec nos gels de

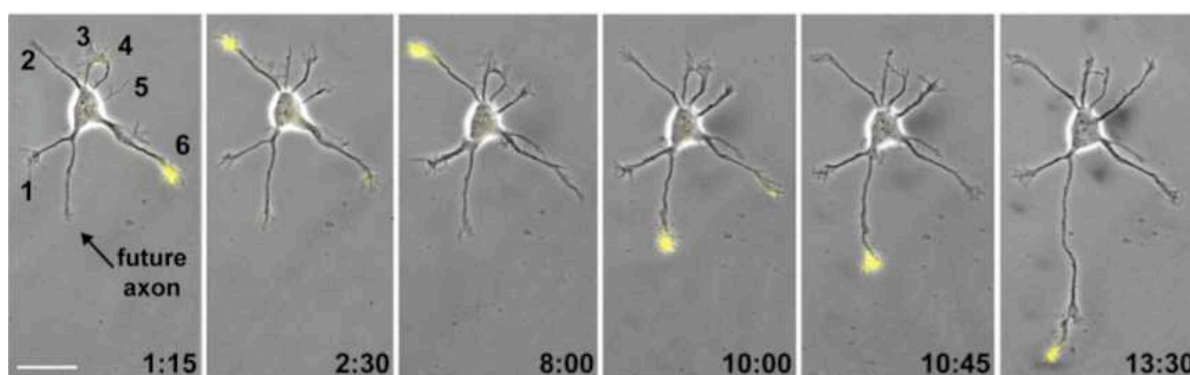


FIGURE 7.4: **Le moteur moléculaire Kif 5C se concentre au niveau du futur axone à un stade précoce du développement (Jacobson C, 2006).** Superposition de la photo en fluorescence de Kif 5C et de celle en contraste de phase d’un neurone d’hippocampe de rat 24h après ensemencement. La temps écoulé est indiqué en bas à droite. La barre d’échelle mesure 25 μ m.

polyacrylamide remplis de microbilles fluorescentes. Ainsi, lors du développement du neurone, le mouvement du centrosome pourrait être repéré en même temps que le développement des forces. Bien que toutes ces expériences nécessitent de nombreuses mises au point techniques, celles-ci sont clairement envisageables.

§. L’auteur de cette publication nous a fait parvenir le plasmide.

Pour conclure, nos motifs constituent de formidables outils pour tenter de comprendre les acteurs biologiques impliqués dans les mécanismes de la différenciation axonale que nous avons mis en exergue dans ce travail.

Bibliographie

- ARIMURA N, KAIBUCHI K. 2007. Neuronal polarity : from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature*, **8**, 194–205.
- BAAS, PW. 1999. Microtubules and neuronal polarity : Lessons from mitosis. *Neuron*, **22**, 23–31.
- BAAS PW, AHMAD FJ. 1993. The transport properties of axonal microtubules establish thier polarity orientation. *The journal of cell biology*, **120**(6), 1427 – 1437.
- BAAS PW, AHMAD FJ. 2001. Force generation by cytoskeletal motor proteins as a regulator of axonal elongation and retraction. *Trends in cell biology*, **11**(6), 244 – 249.
- BAAS PW, DEITCH JS, BLACK MM BANKER GA. 1988. Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons : Uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc.natl.acas.sci.usa*, **85**, 8335–8339.
- BARNES AP, POLLEUX F. 2009. Establishment of axon dendrite polarity in developing neurons. *Annual review of neuroscience*, **32**, 347 – 381.
- BAUDOIN JP, ALVAREZ C, GASPAR P METIN C. 2008. Nocodazole-induced changes in microtubules dynamics impair the morphology and directionality of migrating medial ganglionic eminence cells. *Developmental neuroscience*, **30**(1-3), –.
- BERNAL R, PULLARKAT PA, MELO F. 2007. Mechanical properties of axons. *Physical review letters*, **99**(1), 18301.
- BOIKO T, VAKULENKO M, EWERS H YAP CC NORDEN C WINCKLER B. 2007. Ankyrin-dependant and independant mechanisms orchestrate axonal compartmentalization of l1 family members neurofascin and l1/neuron-glia cell adhesion molecule. *The journal of neuroscience*, **27**(3), 590 – 603.
- BRADKE F, DOTTI C. 2000. Differentiated neurons retain the capacity to generate axons from dendrites. *Current biology*, **10**, 1467 – 1470.
- BRADKE F, DOTTI CG. 1997. Neuronal polarity : Vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron*, **19**(6), 1175 – 1186.
- BRADKE F, DOTTI CG. 1999. The Role of Local Actin Instability in Axon Formation. *Science*, **283**(5409), 1931–1934.
- BUCK KB, ZHENG JQ. 2002. Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *The journal of neuroscience*, **21**, 9358–9367.
- BURACK MA, SILVERMAN MA, BANKER G. 2000. The role of selective transport in neuronal protein sorting. *Neuron*, **26**(2), 465 – 472.

- BURNETTE DT, JI L, SCHAEFER AW MEDEIROS NA DANUSER G FORSCHER P. 2008. Myosin ii activity facilitates microtubule bundling in the neuronal growth cone neck. *Developmental cell*, **15**(1), 163 – 169.
- CHANG S, RODIONOV VI, BORISY G G. POPOV SV. 1998. Transport and Turnover of Microtubules in Frog Neurons Depend on the Pattern of Axonal Growth. *J. neurosci.*, **18**(3), 821–829.
- CHEN CS, MRKSICH M, HUANG S WHITESIDES GM INGBE DER. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science*, **276**, 1425–1428.
- CHEN CS, MRKSICH M, HUANG S WHITESIDES GM INGBER DE. 1998. Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnol.prog.*, **14**, 356 – 363.
- CHEVRIER V, PIEL M, COLLOMB N SAOUDI Y FRANCK R PAINTRAND M NARUMIYA S BORNENS M JOB D. 2002. The rho-associated protein kinase p160 rock is required for centrosome positioning. *J.cell.biol.*, **157**(2), 807–817.
- COJOC D, DIFATO F, FERRARI E SHAHAPURE RB LAISHRAM J RIGHI M DI FABRIZIO EM TORRE V. 2007. Properties of the force exerted by filopodia and lamellipodia and the involvement of cytoskeletal components. *Plosone*.
- CONDRON BG, ZINN K. 1997. Regulated neurite tension as a mechanism for determination of neuronal arbor geometries *in vivo*. *Current biology*, **7**, 813–816.
- CRAIG AM, JAREB M, BANKER G. 1992. Neuronal polarity. *Current opinion in neurobiology*, **2**(5), 602 – 606.
- D, BRAY. 1979. Mechanical tension produced by nerve cells in tissue culture. *J cell sci*, **37**(1), 391–410.
- DE ANDA FC, POLLAROLO G, DA SILVA JS CAMOLETTO PG FEIGUIN F DOTTI CG. 2005. Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature*, **436**, 704–708.
- DENNERLL T, LAMOUREUX P, BUXBAUM RE HEIDEMANN S. 1989. The cytomechanics of axonal elongation and retraction. *The journal of cell biology*, **109**(6), 3073–3083.
- DENNERLL TJ, JOSHI HC, STEEL VL BUXBAUM RE HEIDEMANN SR. 1988. Tension and compression in the cytoskeleton of PC-12 neurites. II : Quantitative measurements. *J. cell biol.*, **107**(2), 665–674.
- DETINGER S, JIANG X, LI Z MURTHY VN WHITESIDES GM. 2002. Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons. *Pnas*, **99**(20), 12542 – 12547.
- DOTTI CG, SULLIVAN CA, BANKER GA. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. neurosci.*, **8**(4), 1454–1468.
- EHRLICHER A, BETZ T, STUHRMANN B GÖGLER M KOCH D FRANZE K LU Y KÄS J. 2007. Optical neuronal guidance. *Pages 495 – 520 of : Cell mechanics*. Methods in Cell Biology, vol. 83. Academic Press.
- ELHERS, MD. 2007. Secrets of the secretory pathway in dendritic growth. *Neuron*, **55**, 686 – 689.
- ERICKSON J, TOOKER A, TAI YC PINE J. 2008. Caged neuron mea : A system for long-term investigation of cultured neural network connectivity. *Journal of neurosciences methods*, **175**, 1 –16.

- ESCH T, LEMMON V, BANKER G. 1999. Local presentation of substrate molecules direct axon specification by cultures hippocampal neurons. *The journal of neuroscience*, **19**, 6417 – 6426.
- FALCONNET D, CSUCS G, GRANDIN, H. MICHELLE, & TEXTOR, MARCUS. 2006. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials*, **27**(16), 3044 – 3063.
- FASS JN, ODDE DJ. 2003. Tensile force-dependent neurite elicitation via anti-b1 integrin antibody-coated magnetic beads. *Biophysical journal*, **85**, 623–636.
- FIALA JC, SPACEK J, HARRIS KM. 2002. Dendritic spine pathology : Cause or consequence of neurological disorders? *Brain research reviews*, **39**(1), 29 – 54.
- FLYNN KC, PAK CW, SHAW AE BRADKE F BAMBURG JR. 2009. Growth cone-like waves transport actin and promote axonogenesis and neurite branching. *Developmental neurobiology*.
- GOMIS-RÜTH S, WIERENGA CJ, BRADKE F. 2008. Plasticity of polarization : Changing dendrites into axons in neurons integrated in neuronal circuits. *Current biology*, **18**(13), 992 – 1000.
- GRABHAM PW., SEALE GE., BENNECIB M GOLDBERG DJ VALLEE RB. 2007. Cytoplasmic Dynein and LIS1 Are Required for Microtubule Advance during Growth Cone Remodeling and Fast Axonal Outgrowth. *J. neurosci.*, **27**(21), 5823–5834.
- HAYASHI K, KAWAI-HIRAI R, HARADA A TAKATA K. 2003. Inhibitory neurons from fetal rat cerebral cortex exert delayed axon formation and active migration in vitro. *Journal of cell science*, **116**, 4419–4428.
- HIGGINBOTHAM H, BIELAS S, TANAKA T GLEESON JG. 2004. Transgenic mouse line with green-fluorescent protein-labeled centrin2 allows visualization of the centrosome in living cells. *Transgenic research*, **13**(2), 155–164.
- HIGGINBOTHAM HR, GLEESON JG. 2007. The centrosome in neuronal development. *Trends in neurosciences*, **30**(6), 276 – 283.
- JACOBSON C, SCHNAPP B, BANKER GA. 2006. A change in the selective translocation of the kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon. *Neuron*, **49**(6), 797 – 804.
- JAEHLING S, THELEN K, WOLFRAMT POLLERBERG GE. 2009. Nanopatterns biofunctionalized with cell adhesion molecule dm-grasp offered as cell substrate : Spacing determines attachment and differentiation of neurons. *Nanoletters*.
- JOCKUSCH, BM. 1983. Patterns of microfilament organization in animal cells. *Molecular and cellular endocrinology*, **29**(1), 1 – 19.
- JUN SB, HYND MR, DOWELL-MESFIN N SMITH KL TURNER JN SHAIN W KIMSJ. 2007. Low-density neuronal networks cultured using patterned poly-l-lysine on microelectrode arrays. *Journal of neuroscience methods*, **160**(2), 317 – 326.
- KIM S, IM WS, KANG L LEE ST CHU K KIM BI. 2008. The application of magnets directs the orientation of neurite outgrowth in cultured human neuronal cells. *Journal of neuroscience methods*, **174**(1), 91 – 96.
- LAMING PR, KIMELBERG H, ROBINSON S SALM A HAWRYLAK N MÜLLER C ROOTS B NG K. 2000. Neuronal-glia interactions and behaviour. *Neuroscience et biobehavioral reviews*, **24**(3), 295 – 340.
- LAMOUREUX P, RUTHEL G, BUXBAUM RE HEIDERMAN S. 2002. Mechanical tension can specify axonal fate in hippocampal neurons. *Journal of cell biology*, **159**(3), 499 – 508.

- LASIECKA ZM, YAP CC, VAKULENKO M WINCKLER B. 2008. Chapter 7 compartmentalizing the neuronal plasma membrane : From axon initial segments to synapses. *International Review of Cell and Molecular Biology*, vol. 272. Academic Press.
- LAUER L, KLEIN C, OFFENHAÜSSER A. 2001. Spot compliant neuronal networks by structure optimized micro-contact printing. *Biomaterials*, **22**, 1925 – 1932.
- LEMMON V, BURDEN SM, PAYNE HR ELMSLIE GJ HLAVIN ML. 1992. Neurite growth on different substrates : permissive versus instructive influences and the role of adhesive strength. *J. neurosci.*, **12**(3), 818–826.
- LI N, FOLCH A. 2005. Integration of topographical and biochemical cues by axons during growth on microfabricated 3d substrates. *Experimental cell research*, **311**, 307 – 316.
- LIN AC, HOLT CE. 2007. Local translation and directional steering in axons. *The embo journal*, **26**, 3729–3736.
- MAHMUD G, CAMPBELL CJ, BISHOP KJM KOMAROVA YA CHAGA O SOH S HUDA S KANDERE-GRZYBOWSKA K GRZYBOWSKI BA. 2009. Directing cell motions on micropatterned ratchets. *Nature physics*.
- MCCAIG CD, RAJNICEK AM, SONG B ZHAO M. 2005. Controlling cell behaviour electrically : Current views and future potential. *Physiol rev*, **85**, 943–978.
- MERZ M, FROMHERZ P. 2005. Silicon chip interfaced with a geometrically defined net of snail neurons. *Advances functional material*, **15**(5), 739 – 744.
- MITCHISON T, KIRSCHNER M. 1984. Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature*, **312**, 232–237.
- NAM Y, BRANCH DW, WHEELER BC. 2006. Epoxy-silane linking of biomolecules is simple and effective for patterning neuronal cultures. *Biosensors and bioelectronics*, **22**(5), 589 – 597.
- NELSON CM, JEAN RP, TAN JL LIU WF SNIADOCKI NJ SPECTOR AA CHEN CS. 2005. Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Pnas*, **102**(33), 11594 –11599.
- NICOLAS, A. 2007. *L'adhésion cellulaire : une sonde de l'environnement mécanique dans les tissus*. Images de la physique 2007.
- OLIVA AA, JAMES JCD, KINGMAN CE CRAIGHEAD HG BANKER GA. 2003. Patterning axonal guidance molecules using a novel strategy for microcontact printing. *Neurochemical research*, **28**(11), 1639 – 1648.
- O'TOOLE M, LAMOUREUX P., MILLER KE. 2008. A physical model of axonal elongation : force, viscosity, and Adhesions govern the mode of outgrowth. *Biophysical journal*, **94**, 2610–2620.
- PARK HT, WU J, RAO Y. 2002. Molecular control of neuronal migration. *Bioessays*, **24**(9), 821–827.
- PARKER KK, BROCK AL, BRANGWYNE C MANNIX RJ WANG N OSTUNI E GEISSE NA ADAMS JC WHITESIDES GM INGBER DE. 2002. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *Faseb j.*, **16**(10), 1195–1204.
- REED NA, CAI D, BLASIUS TL JIH GT MEYHOFFER E GAERTIG J VERHEY KJ. 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Current biology*, **16**, 2166–2172.

- RUIZ SA, CHEN CS. 2008. Emergence of patterned stem cell differentiation within multicellular structures. *Stem cells*, **26**(11), 2921–2927.
- RUTHEL G, BANKER G. 1998a. Actin-dependent anterograde movement of growth-cone-like structures along growing hippocampal axons : A novel form of axonal transport? *Cell motility and the cytoskeleton*, **40**, 160–173.
- RUTHEL G, BANKER G. 1998b. Role of moving growth cone ?like ?wave ? structures in the outgrowth of cultured hippocampal axons and dendrites. *Journal of neurosciences*, **39**, 97–106.
- RUTHEL G, HOLLENBECK PJ. 2000. Growth cones are not required for initial establishment of polarity or differential axon branch growth in cultured hippocampal neurons. *The journal of neuroscience*, **20**(6), 2266–2274.
- SCHOLL M, SPRÖSSLER C, DENYER M KRAUSE M NAKAJIMA K MAELICKE A KNOLL W OFFENHÄUSSER A. 2000. Ordered networks of rat hippocampal neurons attached to silicon oxide surfaces. *Journal of neuroscience methods*, **104**, 65 – 75.
- SF, HAMM-ALVAREZ. 1998. Molecular motors and their role in membrane traffic. *Advanced drug delivery reviews*, **29**(3), 229 – 242.
- SOCOL M, WEIDENHaupt M, LEFRAN C DELABOUGLISE D BRUCKERT F. 2008. *Electrostatic control of d.disciudeum adhesion and spreading*. Poster Session : Minattec Crossroads 2008.
- STENGER DA, HICKMAN JJ, BATEMAN KE RAVENSCROFT MS MA W PANCRAZIO JJ SHAFFER K SCHAFFNER AE CRIBBS DH COTMAN CW. 1998. Microlithographic determination of axonal/dendritic polarity in cultured hippocampal neurons. *The journal of neuroscience methods*, **82**, 167 – 173.
- SUTER DM, FORSCHER P. 1998. An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Current opinion in neurobiology*, **8**(1), 106 – 116.
- TAN JL, TIEN J, PIRONE DM GRAY DS BHADRIRAJU K CHEN CS. 2003. Cells lying on a bed of microneedles : An approach to isolate mechanical force. *Pnas*, **100**(4), 1484–1489.
- THÉRY M, PÉPIN A, DRESSAIRE E CHEN Y BORNENS M. 2006a. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell motility and the cytoskeleton*, **63**, 341 – 355.
- THÉRY M, RACINE V, PIEL M PÉPIN A DIMITROV A CHEN Y SIBARITA JB BORNENS M. 2006b. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Pnas*, **103**(52), 19771–19776.
- THÉRY M, RACINE V, PÉPIN A PIEL M CHEN Y SIBARITA JB BORNENS M. 2005. The extracellular matrix guides the orientation of cell division axis. *Nature cell biology*, **7**, 947 – 953.
- VALLEE RB, SEALE GE, TSAI JW. 2009. Emerging roles for myosin ii and cytoplasmic dynein in migrating neurons and growth cones. *Cell*.
- VOGT AK, STEFANI FD, BEST A NELLES G YASUDA A KNOLL W OFFENHÄUSSER A. 2004. Impact of micropatterned surfaces on neuronal polarity. *Journal of neuroscience methods*, **134**(2), 191 – 198.
- VOGT AK, LAUER L, KNOLL W OFFENHÄUSSER A. 2003. Micropatterned substrates for the growth of functional neuronal networks of defined geometry. *Biotechnology progress*, **19**, 1562 – 1568.

- VOGT AK, WROBEL G, MEYER W KNOLL W OFFENHÄUSSER A. 2005. Synaptic plasticity in micropatterned neuronal networks. *Biomaterials*, **26**(15), 2549 – 2557.
- WANG N, OSTUNI E, WHITESIDES GM INGBER DE. 2002a. Micropatterning tractional forces in living cells. *Cell motility and the cytoskeleton*, **52**, 97–106.
- WANG N, OSTUNI E, WHITESIDES GM INGBER DE. 2002b. Micropatterning tractional forces in living cells. *Cell motility and the cytoskeleton*, **52**, 97–105.
- WEN Z, GUIRLAND C, MING GL ZHENG JQ. 2004. A camkii/calcineurin switch controls the direction of ca^{2+} dependent growth cone guidance. *Neuron*, **43**, 835–846.
- WITTE H, BRADKE F. 2008a. The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Current opinion in neurobiology*, **18**(5), 479 – 487. Neuronal and glial cell biology.
- WITTE H, NEUKIRCHEN D, BRADKE F. 2008b. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *Journal of cell biology*, **180**(3), 619–632.
- WYAR C, YBERT C, BOURDIEU L HERR C PRINZ C CHATENAY D. 2002. Constrained synaptic connectivity in functional mammalian neuronal networks grown on patterned surfaces. *Journal of neuroscience methods*, **117**, 123 – 131.
- ZHANG Z, YOO R, WELLS R BEEBE TP BIRAN R TRESKO P. 2005. Neurite outgrowth on well characterizes surfaces : remanation and characterization of chemically and spatially controlled fibronectin and rgd substrates with good bioactivity. *Biomaterials*, **26**, 47 – 61.
- ZMUDA JF, RIVAS RJ. 1998. The golgi apparatus and the centrosome are localized to the sites of newly emerging axons in cerebellar granule neurons in vitro. *Cell motility and the cytoskeleton*, **41**, 18–38.